

## *Eucalyptus robusta* における フェニルアラニンアンモニアリアーゼ遺伝子の解析

植木悠貴<sup>\*1,\*3</sup>・秋元真也<sup>\*1,\*4</sup>・寺田珠実<sup>\*1</sup>・鮫島正浩<sup>\*1</sup>・鴨田重裕<sup>\*2</sup>

### Analysis of the Phenylalanine Ammonia-Lyase Gene in *Eucalyptus robusta*

Yuki UEKI<sup>\*1,\*3</sup>, Shinya AKIMOTO<sup>\*1,\*4</sup>, Tamami TERADA<sup>\*1</sup>,  
Masahiro SAMEJIMA<sup>\*1</sup>, Shigehiro KAMODA<sup>\*2</sup>

#### 1. 緒言

ユーカリ属 (*Eucalyptus*) には、800 種類以上の種が存在するといわれているが、成長が非常に早く主にパルプ用材として植林されている樹種がある (中村, 2008)。また精油成分や抗酸化物質などの有用な二次代謝成分を含有する樹種もある (西村, 1987)。その中で *Eucalyptus robusta* はその葉に抽出成分としてフェノール性成分を乾重量当たり 10% と多量に含有している (秋元, 2012b)。フェニルプロパノイド生合成経路はフェノール性成分の生合成に関わっている。フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (phenylalanine ammonia-lyase : PAL) はこの経路の出発点となるフェニルアラニンを脱アミノ化し桂皮酸を生成する鍵酵素である。さまざまなフェノール性成分の生成に重要な役割を持つために PAL は植物の中で最も広く研究されてきた酵素の 1 つである。PAL は多重遺伝子族を形成する (Joos, 1992; SHANG, 2012) ものが多く、複数の PAL を有する場合、リグニン合成にかかわるもの、植物の防御反応にかかわるものなど、それぞれが異なった役割を持っている (OLSEN, 2008) ことがある。

私たちは以前より *E. robusta* 培養細胞 (以下 *Er* 培養細胞とする) を用いたフェノール性成分と PAL に関する以下のような研究を行ってきた。AKIMOTO (2013) は *ErPAL1* (AB698855) のクローニングを行い、ユーカリで初めて組換え PAL (*ErPAL1*) タンパク質を発現させ、その酵素活性を解析した。また秋元 (2012b) は *ErPAL1* のほかに複数の PAL 遺伝子が存在している可能性を示唆した。2011 年に *E. camaldulensis* (HIRAKAWA, 2011) で、2014 年に *E. grandis* (MYBURG, 2014) で全ゲノム情報が開示された。とくに *E. grandis* では計 9 つの PAL 遺伝子 (*EgrPAL1-9*) の存在が報告された。さらに CAROCHA (2015) がそれらの遺伝子の解析を進めていった。ユーカリの PAL 遺伝子情報を表 - 1 に示した。しかし 800 種以上もあるといわれて

\*1 東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学専攻  
Department of Biomaterial Sciences, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

\*2 東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林樹芸研究所

Arboricultural Research Institute, The University of Tokyo Forests, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

\*3 現所属 JA 全農

ZEN-NOH

\*4 現所属 王子製紙株式会社

Oji Paper Co., Ltd

表-1 ユーカリ樹木の PAL 遺伝子の Accession Number  
Table1 Accession numbers of *Eucalyptus* PAL genes

Accession No.		
<i>E. globulus</i>	AB591305	partial
<i>E. pilularis</i>	AB591302	partial
<i>E. grandis</i>		
EgrPAL1	XM_010069828.1	PAL
EgrPAL2	XM_010051239.1	PAL-like
EgrPAL3	XM_010069013.1	PAL
EgrPAL4	XM_010069014.1	PAL
EgrPAL5	XM_010069015.1	PAL-like
EgrPAL6	XM_010069016.1	PAL
EgrPAL7	XM_010069017.1	PAL-like
EgrPAL8	XM_010033665.1	PAL-like
EgrPAL9	XM_010033852.1	PAL-like

いるユーカリ属樹木の中で PAL 遺伝子の全長は *E. robusta* から 1 つと *E. grandis* から 9 つの遺伝子が公開されているにすぎず、情報量は極めて少ない。そこで本研究では、*Er* 培養細胞から DNA と mRNA を得て、それぞれから新しい PAL 遺伝子配列を明らかにすること、mRNA から得た新たな遺伝子配列に関しては酵素としての機能を確認することを目的とした。

## 2. 実験

### 2.1 材料

材料として、東京大学大学院農学生命科学研究科森林化学研究室で 14 日ごとに継代保持している *E. robusta* (*Er*) 培養細胞を使用した。培地組成は表-2 の通りである。成長は細胞をろ過し、生重量を測定することで示した。

### 2.2 フェノール性成分の検出と定量

#### 2.2.1 フェノール性成分の抽出

まず供試した材料がフェノール性成分を有しているかどうかを確認することにした。*Er* 培養細胞の絶乾重量を測定後、重量の約 10 倍となるように 80% メタノールを加えて 1 ヶ月間抽出した。

表-2 *Er* 培養細胞の培地の組成  
Table2 Composition of medium of *E. robusta* cultured cells

LS 培地 (1L 中)	pH5.8-6.0				
シヨ糖(g)	30	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025
		MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	22.3	ZnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	8.6
イノシトール	100	KNO <sub>3</sub>	1900	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	370
塩酸チアミン	1000	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
		MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	KI	0.83
2,4-D	0.5	Na <sub>2</sub> -EDTA	37.3	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25
カイネチン	0.4	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440

(シヨ糖以外はすべて mg)

### 2.2.2 フェノール性成分の分析

フェノール性成分の抽出に用いた 80% メタノール抽出液をフェノール定量結果が検量線内におさまるよう、水で希釈したのち、Folin-Denis 法 (FOLIN, 1915) でフェノール量を定量した。すなわち 500 $\mu$ l のサンプルに 500 $\mu$ l の Folin-Denis 試薬 (タングステン酸ナトリウム 25g, リンモリブデン酸 5g, リン酸 12.5ml, 水 188ml) を混合して 2 時間沸騰後、水を加えて 1000ml に調製したものを加えたのち、3 分後に 10% 炭酸ナトリウムを 500 $\mu$ l 加え、60 分後に 13000  $\times$  g で 5 分間遠心分離を行い、上澄みを取って 700nm の吸光度 (分光光度計 V-530 (JASCO 社)) を測定した。検量線は没食子酸を用いて作成した。加えて DMACA 法 (ARNOUS, 2002) に基づき、フラバノールの定量を行った。抽出液を適当にメタノールで希釈した液 25 $\mu$ l に DMACA 試薬 (ジメチルアミノ桂皮アルデヒド 20mg, 塩酸 1.6ml, メタノール 18.4ml) を混合したものを 1ml を加えて、3 分後に 638nm の吸光度を測定した。検量線はカテキンを用いて作成した。

### 2.2.3 分光光度計を用いた PAL 活性の検出

培養細胞に同量のポリビニルピロリドンを加えたものを 50mM トリシン-NaOH 緩衝液 (pH8.8) 中でガラス製ポッター型ホモジナイザーを用いて粉碎して調製した粗酵素液 1ml に 60mM フェニルアラニン 0.25ml を添加して 40 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させた。1M 塩酸 0.2ml で反応を停止させ、同様に調製した反応 0 時間のサンプルを対照に 280nm の吸光度 (分光光度計 UV1101 (WPA 社)) を測定した。生成した桂皮酸量を PAL 活性とみなした。

## 2.3 PAL 遺伝子の解析

### 2.3.1 ゲノム DNA ならびに mRNA の抽出と cDNA の合成

*Er* 培養細胞を液体窒素中で粉末状にし、植物用 DNA 抽出キット DNeasy Plant Mini kit (Qiagen 社) を用いて添付のプロトコールに従いゲノム DNA を抽出した。同様にして培養細胞を粉末状にし、植物用 RNA 抽出キット RNeasy Plant Mini kit (Qiagen 社) を用いて添付のプロトコールに従い全 RNA を抽出した。全 RNA から PolyAtract<sup>®</sup> mRNA Isolation System II&III (Promega 社) を用いて mRNA を抽出した。得られた mRNA から cDNA Synthesis Kit (M-MLV Version) (Takara 社) を用いて cDNA を合成した。

### 2.3.2 電気泳動

0.75% のアガロースを支持体として、TAE 緩衝液 (40mM Tris, 20mM 酢酸ナトリウム, 1mM EDTA  $\cdot$  2Na) をゲル作成時ならびに泳動時に用いた。DNA 産物の確認は、サンプルに GR Green Loading Buffer (バイオクラフト社) を加えて泳動したのち、LED イルミネータ (バイオクラフト社) を用いて行った。

### 2.3.3 ゲノムウォーキング法によるプライマーの作製

Clontech 社の Genome Walker Universal kit を用いて、新たな PAL 遺伝子の全ゲノム配列決定を試みた。まず 2.3.1 で抽出したゲノム DNA を制限酵素 *Dra*I, *Hpa*I, *Nsb*I で完全消化 (37 $^{\circ}$ C) を行った。次にフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール (25:24:1) を用いて反応を止め、エタノール沈殿により DNA 断片の精製を行った。その後、キット付属のプロトコールに従いアダプター付加を行った。

アダプター付加された DNA 断片群をテンプレートとして、アダプター配列にアニールするプライマー、AP1 (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3') と、既知の PAL 遺伝子の部分配列 (秋元, 2012a) に特異的なプライマー、上流 GPS1, 下流 GPS1 (表-3) を用いて、94℃ :2分, (94℃ :25秒, 72℃ :3分) × 7cycle, (94℃ :25秒, 67℃ :3分) × 36cycle, 67℃ :7分の条件で PCR (Veriti200 (ABI社)) を行った。溶液の組成は表-4 に示す通りである。

続いて、30 倍に希釈した PCR 産物をテンプレートとして、アダプター配列にアニールするプライマー、AP2 (5'-ACTATAGGGCAGCGTGGT-3') と、PAL 遺伝子部分配列に特異的なプライマー、GPS2 (それぞれ上流 GPS1 よりも 5' 上流, 下流 GPS1 よりも 3' 下流に位置するプライマー (表-3)) を用いて 94℃ :2分, (94℃ :25秒, 72℃ :3分) × 5cycle, (94℃ :25秒, 67℃ :3分) × 24cycle, 67℃ :7分の条件で再び PCR を行った。

この PCR 産物の塩基配列を取得した。取得した配列を参考にして表-3 に示したような新たな PAL 遺伝子に特異的な各種プライマー (fl, fa, rc, r3 など) を構築した。上記の新たなプライマーセット (例えば fl と rc, fa と r3 など) を用いてそれぞれ PCR 反応を行い、それらのプライマーを用いて PCR 産物のシーケンス配列解読を行った。最終的に新たな PAL 様全塩基配列の 5' 末端の外側と 3' 末端にそれぞれ位置するプライマーを構築した。

表-3 PCR およびシーケンス反応の際に用いたプライマー  
Table3 Primers used in cloning (PCR and sequence)

ErPAL2 クローニングの際に使用したプライマー	
af2	CTAGACGTTTCGCATTCACAC
ar2	GATTTGGAAAAGTTTCTAAC
fl	ATGGACATGGACACGGCAGCG
r3	CTAACAGATGGGAAGCGGAGC
fa	TCTGCAGACGGAGCTCATAAG
ra	CTTATGAGCTCCGTCTGCAGA
f2	CCTTGCGCTCGTGAATGGCAC
r2	GTGCCATTACGAGCGCAAGG
fc	AAGGCTCTCAATGGAGGGAA
rc	TTCCCTCCATGGAGAGCCTT
rd	GCCGTTGGACCCGACGTAGAG
<i>EcoRI</i> f	CAGAATTCTATGGACATGGACACGGCAGCG
<i>XbaI</i> r	CATTCTAGACTAACAGATGGGAAGCGGAGC
ゲノムウォーキングの際に使用したプライマー	
上流 GPS1	TTTGGTGGCGGCCCTGATCACTTCGAT
上流 GPS2	AGGGTCGATCTCGTGGAGCTTTTGAGCG
下流 GPS1	CGTGCTGAAGCTCATGTCCTCCACCTT
下流 GPS2	GAACCAAGTGGCCAAGAAGGTCTCT
vector に導入された配列を増幅させる際に使用したプライマー	
SP6	ATTTAGGTGACACTATAGAA
T7	TAATACGACTCACTAT
cDNA 合成の際に用いたプライマー	
Oligo(dT)18	(GA) <sub>10</sub> CTCGAGCGGCCG(T) <sub>18</sub> V (V=AorCorG)

表- 4 PCR 混合溶液の組成  
Table4 Composition of reaction liquids for PCR

a	
水	35μl
10×Ex Taq Buffer(Takara)	5μl
dNTPmix(Takara)	4μl
Ex TaqHS(Takara)	0.5μl
プライマー-AP1 または AP2	1μl
プライマー-GP1 または GP2	1μl
DMSO	2.5μl
テンプレート	1μl
全量	50μl

b	
水	12.3μl
10×Ex Taq Buffer(Takara)	2μl
dNTPmix(Takara)	1.6μl
Ex TaqHS(Takara)	0.1μl
<i>ErPAL2</i> 特異的プライマー	1μl
<i>ErPAL2</i> 特異的プライマー	1μl
DMSO	1μl
テンプレート	1μl
全量	20μl

c	
水	6.3μl
10×Ex Taq Buffer(Takara)	2μl
dNTPmix(Takara)	1.6μl
Ex TaqHS(Takara)	0.1μl
プライマー-SP6	1μl
プライマー-T7	1μl
テンプレート	8μl
全量	20μl

### 2.3.4 TA クローニングと塩基配列の解析

2.3.3 で構築したプライマーセット (表- 3) を用いて, 2.3.1 で抽出したゲノム DNA をテンプレートとして 94°C :1 分, (94°C :20 秒, 55°C :20 秒, 72°C :25 秒) ×35cycle, 72°C :2 分の条件で PCR を行った。

PCR 産物を精製 (NucleoSpin Gel & PCR Clean-up (Takara 社)) したのち, pGEM T Easy Vector (Promega 社) にライゲーションした。コンピテントセル *E.coli* DH5α (Takara 社) を形質転換して, アンピシリン 100μg/ml 入りの LB 培地上, 37°C で一晩培養した。コロニーから, 緩衝液の代わりに水を用いたボイル法 (HOLMES, 1981) の変法で DNA を調製し, pGEM T Easy Vector のクローニングサイトの外側に位置する T7 ならびに SP6 プロモーター配列のプライマーを用いて PCR 反応を行った。電気泳動でサイズを確認したうえで PCR 産物の塩基配

列を決定した。日本 DNA データバンク (DDBJ) の BLAST 検索を用いて配列の解析を行った。アミノ酸配列は Sequence Translation ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss\\_transeq/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/)) を利用して得られた塩基配列から予想した。予想されたアミノ酸配列の解析には NCBI Blast : Protein Sequence (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いた。DDBJ の Clustal W (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/index.php?lang=ja>) を用いてそれぞれの配列の比較を行った。

### 2.3.5 cDNA を用いたクローニング

2.3.1 で調製した cDNA をテンプレートにした PCR を、制限酵素サイト付のプライマーセット *EcoRI*f と *XbaI*r (表-3) を用いて行った。*EcoRI* と *XbaI* の 2 つの制限酵素で double digest を行ったのち、同様に制限酵素処理を行った発現ベクター pEcoli-Nterm 6×NH (Clontech 社) にライゲーションした。コンピテントセル BL21 (DE3) (Promega 社) を形質転換して、アンピシリン 100µg/ml 入りの LB 培地上、37°C で一晚培養した。コロニーからボイル法の変法で DNA を調製し、pEcoli-Nterm 6×NH のマルチクローニングサイトの外側に位置するプライマーセット、F (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') と R (5'-TAGGCATAGGCTTGGTTATGC-3') を用いて PCR 反応を行った。電気泳動でサイズを確認したのち、2.3.4 と同様にして配列を決定し、解析を行った。

### 2.3.6 酵素発現と HPLC を用いた PAL 活性測定

PAL 様配列が組み込まれた発現ベクターを有する大腸菌のコロニーを爪楊枝でつつき 5ml の LB 液体培地に落として 37°C で 1 晩振とう培養した。この培養液 100µl を、100µg/ml のアンピシリン入りの LB 液体培地 100ml に加えて 37°C で培養した。OD<sup>600</sup> = 0.6 付近で終濃度が 0.5mM になるように IPTG を加えて 37°C で 4 時間培養したのち、サンプルを 4°C、3000×g で 20 分間遠心した。得られたペレット 100mg に付き 2ml の TALON x Tractor Buffer (Clontech 社) を加えた。ここに 2ml の Buffer あたり 5units の DNase (Takara 社) を加えて混和したのち、氷上で 15 分間インキュベートした。これを 4°C、10000 × g で 20 分間遠心を行い、上澄み液を粗酵素液とした。分光光度計を用いた PAL 活性測定法により活性が検出されたサンプルについては引き続きカラム (HisTALON Superflow 1ml Cartridge (Clontech 社)) 精製に供した。この抽出液を用いて 2.2.3 と同様に酵素反応を行った。反応停止後のサンプル 500µl を 1ml の酢酸エチルに転溶し、11000 × g で 5 分間遠心後、酢酸エチル層 500µl を乾固させた。200µl のメタノールに再溶解させて遠心分離 (11000 × g) を行い、上澄み液を HPLC に供した。HPLC の使用条件を表-5 に示した。

表-5 HPLC の条件

Table5 Conditions of HPLC systems

機種:AS-2057Plus(JASCO 社)

カラム:CAPCELL PAK C18MG II 150mm×φ4.6mm(資生堂)

溶離液:メタノール:0.005%TFA 水=80:20

流速:0.5ml/min

検出波長:UV280nm

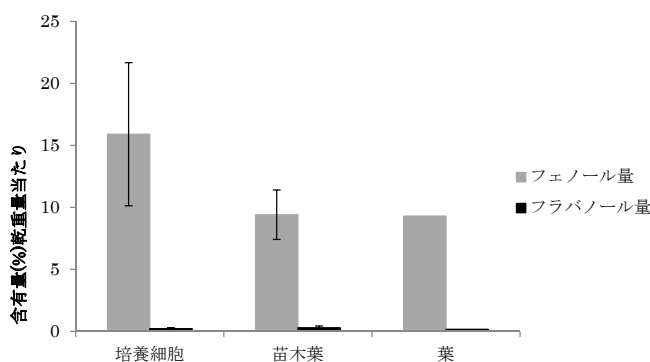


図-1 *E.robusta* 培養細胞と葉に含まれるフェノール量とフラバノール量

Fig.1 Contents of total phenolics and flavanol in *E. robusta* leaves and cultured cells

### 3. 結果と考察

#### 3.1 フェノール性成分の分析と PAL 活性の挙動

Folin-Denis 法を用いた *Er* 培養細胞における総フェノール量は乾重量当たり約 16%であった (図-1)。DMACA 法を用いたフラバノール量は乾重量当たり約 0.2%で、総フェノール量に対するフラバノール量の割合は約 1.3%と非常に小さかった。*E. robusta* 葉の成分量と比較するとむしろ培養細胞に多量のフェノール性成分が含まれていることがわかった。またとくに総フェノール量はほかのユーカリ樹木 (*E. haemastoma*, *E. piperita*, *E. signata*) の葉に含まれている量 (秋元, 2012b) に匹敵するほど多いことがわかった。

PAL 活性の経日変化を図-2に示した。サンプルにかかわらず成長は安定しているものの、PAL 活性の挙動はサンプルごと、測定時期ごとに大きく異なったため、以降の遺伝子解析は継代時の細胞をサンプルとして用いることにした。

#### 3.2 PAL の遺伝子解析

##### 3.2.1 ゲノムウォーキング法によるプライマーの作製

ゲノムウォーキング法を用いることによって *ErPAL1* とは異なる新たな PAL 遺伝子全塩基配列が得られた。この新たな PAL 遺伝子の全長を増幅するような af2 と ar2 プライマーを設計した。そのほか今回構築したプライマーならびに本研究で使用した全プライマーを表-3にまとめて記した。また位置関係を図-3に示した。

##### 3.2.2 塩基配列の解析

ゲノム DNA をテンプレートにして、新たな PAL 遺伝子の全長を増幅するように設計された af2 と ar2 プライマーセットを用いて PCR を行った。その PCR 産物を TA クローニングに供したところ、長さの異なる配列が多く得られ、そのうち 5 つの全配列を決定し (植木, 2015), *ErPALdA*, *ErPALdB*, *ErPALdC*, *ErPALdD*, *ErPALdE* と名付けた。それぞれの長さは *ErPALdA* が 2728bp, *ErPALdB* が 2729bp, *ErPALdC* が 2730bp, *ErPALdD* が 2733bp, *ErPALdE* が 2727bp であった。同様に cDNA をテンプレートにした PCR 産物からは 4 つの全配列が決定され (植木, 2015), 全て 2145bp であった。これらを *ErPALA*, *ErPALB*, *ErPALC*, *ErPALD* と

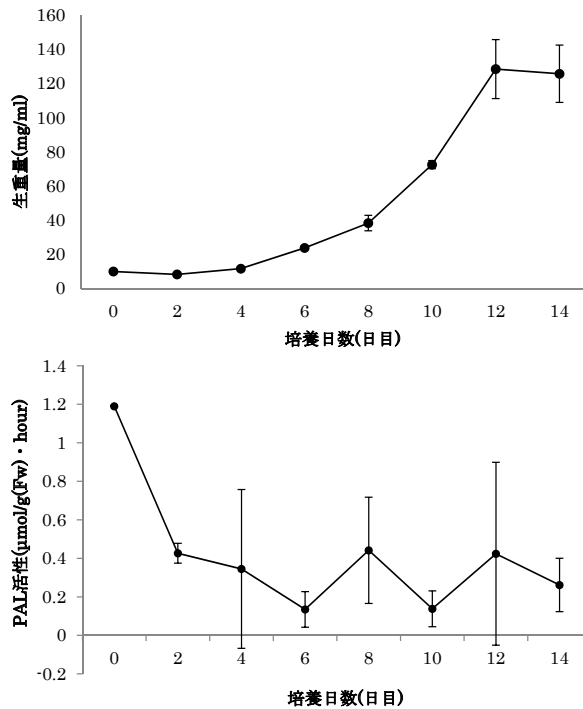


図-2 *E. robusta* 培養細胞の成長 (a) と PAL 活性 (b) の経日変化  
Fig.2 Daily changes in growth and PAL activity of *E. robusta* cultured cells

名付けた。図-4に今回配列を決定した *ErPALC* の全塩基配列を示した。既にクローニングされている *ErPALI* とは 80% 以上の同一性を示した。また今回配列決定した新たな *ErPAL* の 9 つの配列は互いに 96-99% と高い類似性を有していた。それ以外に今回部分配列のみ読解され、全配列決定に至らなかった PAL 様遺伝子が複数存在している可能性があり、*E. robusta* は多くの PAL 様配列を有することがわかった。緒言では PAL は多重遺伝子族を形成しているものが多いと述べた。一般的に植物では 4 つの PAL (REICHERT, 2009) を有するのが主流であるといわれている。例外的に *Solanum tuberosum* は 40-50 の PAL 遺伝子を有する (Joos, 1992)。*E. robusta*

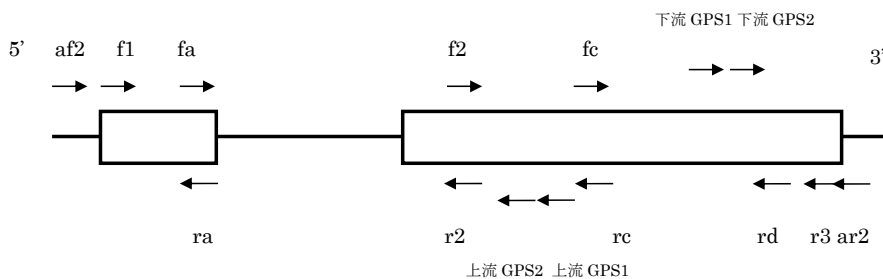


図-3 PCR およびシーケンス反応の際に用いたプライマーの遺伝子上の位置  
□: エキソン —: イントロンならびにフランキング領域

Fig.3 Location of some primers using a PCR and sequence analysis



が多くの PAL 様配列を有している理由については不明である。

*ErPAL1* の配列を参考に *ErPALdA-dE* の構造を予想解析した結果、いずれも 2 つのエキソンとその間に挟まれた 1 つのイントロンで構成されていることがわかった。とくに被子植物の PAL ではイントロンを 1 つ保持する構造が多くみられる。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の *AtPAL3* (WANNER, 1995) のようにイントロンが 2 つあるものやイチョウ (*Ginkgo biloba*) の *GbPAL* (Xu, 2008) のようにイントロンがない場合もあるが、多くの植物ではシロイヌナズナの *AtPAL1, 2* (WANNER, 1995) やコーヒー (*Coffea canephora*) の *CcPAL1-3* (LEPELLEY, 2012) のようにイントロンを 1 つ保持する構造である (図-5)。第 1 エキソンは 395bp, 第 2 エキソンは 1750bp であり、イントロンの長さは 582-588bp で 5 つ全ての配列で長さが異なっていた。イントロンの境界は GT/AG で、イントロン部分の A/T 塩基の割合は約 70% と AT-rich な配列となっていた (植木, 2015)。これは植物における一般的なイントロン構造と一致する (LORKOVIC, 2000)。

### 3.2.3 予想されるアミノ酸配列の解析

ゲノム DNA から得た塩基配列の予想されるイントロン部分を除いた翻訳領域は全て 2145bp で、714 残基のアミノ酸配列に翻訳することができた。cDNA から得た塩基配列も同様に 714 残基のアミノ酸配列に翻訳することができた。図-4 に今回配列を決定した *ErPALC* の全塩基配列から予想されるアミノ酸配列を付記した。予想されるアミノ酸配列を用いて BLAST 検索を行ったところ、*ErPAL1* とは 85-86% の類似性があった。柑橘類の *Citrus clementina*, *Citrus sinensis* の PAL (それぞれ XM 006436383, KK785221) と 84-86% と *E.robusta* 以外の植物 PAL との類似性も高かった。

図-6 に今回配列を決定した全ての PAL 様遺伝子配列から予想されるアミノ酸配列のアラインメントを一部抜粋して示した。予想されるアミノ酸配列全てで、PAL の活性中心で重要な役割を果たす MIO ドメイン (ALUNNI, 2003) を形成する Ala-Ser-Gly (ASG) やその付近のアミノ酸配列、PAL の活性に関わる保存性の高いアミノ酸残基を確認することができた (図-4, 6)。今回得られた塩基配列は全て PAL 遺伝子である可能性が高いことが示された。しかし 3.2.2 で述べたように今回配列を決定したもののほかにまだ複数存在している可能性があり、今後それらの配列全ての比較が必要であると考えらる。

### 3.2.4 既知の植物 PAL との比較

緒言で述べたようにユーカリ属では *E. robusta* のほかに *E. grandis* で PAL 遺伝子全配列に関する情報が公開されている。その他のユーカリ属では、*E. globulus* や *E. pilularis* の PAL 遺伝子の塩基配列の部分配列のみが明らかになっているにすぎない。*E. globulus* と *E. pilularis* の部分配列は *E. robusta* の新たな PAL 遺伝子類とは 80% 以上の類似性を示した。*ErPAL1* の塩基配列と 95-99% の類似性を示したため、これらの部分配列は *ErPAL1* に近いものと考えられる。今回得られた新たな *ErPAL* 遺伝子配列は全て、*EgrPAL3-7* (MYBURG, 2014) と 95-99% の類似性を示した。さらに塩基配列の構造ならびにエキソン部の塩基数も *EgrPAL3-7* の配列と合致していた。

そこで予想されるアミノ酸配列を詳細に比較してみることにした (図-7)。同じ植物の PAL でも担う役割の違いで分類されることがある。例えば 2 つの PAL を持つアスペン (*Populus*

```

atggacatggacacggcagcgtgcaacggcaaggctccctcgggcoctgcacggggcaggtagtgac
M D M D T A A C N G K G S L G P C T G A G G D
ccgctcaattggggcccgctgctgagccctcaggggagccacctgatgaggtgaagcgatggctc
P L N W G A A A A A L T G S H L D E V K R M V
gaggatccggcgacactgtgctcgccttgcggtgagacgtgacctogcaggtggcgccatc
E E S R R P V V R L G G E T L T I A Q V A A I
ggggcgagggccggcatggcggtgagctgtggagggccggccgggggccaaggccaagcagc
A G R E A G M A V E L S E A A R A G V K A S S
gactgggtgatggagacatgagcaaggccagcagcactcgggtcaccactggcttcggcgccacc
D W V M E S M S K G T D S Y G V T T G F G A T
tcgcataggcgccaagcaagtggtgctctgaggggagctcataaggttcttgaacggcgata
S H R R T K Q G G A L Q R E L I R F I N A G I
ttcgcaatgggactgagctgcccacgctgccccactcgggaccgggctgogatgctgtgagg
F G N G T E S C H T L P H S A T R A A M L V R
atacaaccctcctcaggctactcgggcatcggttcgatgactcggagaccatggccaagctcctc
I N T L L Q G Y S G I R F E I L E T M A K L L
aaccgcaacatcacccgtgctcctcctcagggtacgatcaggcctcggcgacctggctcccttg
N R N I T P C L P L R G T I T A S Q D L V P L
tcctacatcggcggtctcagggcagcccaactogaaggctcggcccaaacggcgagctcgtg
S Y I A G L L T G R P N S K A V G P N G E S L
aacgctgtgagccttcgcttgcgggatcgagcagggctctttgacctgagcccaagaggggc
N A V E A F R L A G I E H G F F D L Q P K E G
cttgcgctgtaatggcaaggcagctgggtctgggctcgttccattgctgtacgaggcgaacatc
L A L V N G T A V G S G L A S I V L Y E A N I
ctgcccctcctcagaggtctctgagcgtctcggcgaggtgatgcaagggaagccggatccacc
L A V L S E V L S A I F A E V M Q G K P E F T
gaccacttgaccacaagctcaagcaccctccggcacaattgaagctgcgctataatggagcacatc
D H L T H K L K H H P G Q I E A A A I M E H I
ttgattgggagctcactggaaggcctcaaaagctccagagatggaacctcctcagaaagccgaag
L D G S S Y V K D A Q K L H E M D P L Q K P K
caggaccgatagcgtcctcgcagctccccagtggtcggccccagatgaagtgatcagggccgcc
Q D R Y A L R T S P Q W L G P Q I E V I R A A
accaaaaatgatcaggggagatcaattctgtcaacgacaaccgctgatcagctctccaggaacaag
T K M I E R E I N S V N D N P L I D V S R N K
gctctcattggaggaaactccaggggaaccgattggcgttccottggacaacaccgctcgcctc
A L H G G N F Q G T P I G V S L D N T R L A I
gcctccatcggcgaagctatgttgcgcaagttctccgagctcgaagcttctacaacaacgggctg
A S I G K L M F A Q F S E L V N D F Y N N G L
ccctcaactatccggggagcgaaccaagcttgattacggtcctcaaggagctgagatagccatg
P S N L S G G R N P S L D Y G F K G A E I A M
gcctcactatgctggagctcagtttctgccaacctgtgaccaacctgtccagagcggagcaa
A S Y C S E L Q F L A N P V T N H V Q S A E Q
cacaaccaggaagctgaactccttggcgctgatctgctgaggaagaccggaggccctgagctgctg
H N Q D V N S L G L I S S R K T A E A V D V L
aagctatgtctccaccttctggtcgcctgtgccaggcctcagctgaggcaccctggaagagaac
K L M S S T F L V A L C Q A I D L R H L E E N
ctcaagagctgtgtaagaacaagtgaaacaagtgcccaagaagttcctcactcgggtccaagcgc
L K S V V K N T V N Q V A K K V L Y V G S N G
gagctcaccctcggcttcaagcagaagacctgatcaaggtggtcagccggagtagctctcgc
E L H P S R F S E K D L I K V V D R E Y V F A
tacatgatgaccctgcagocacgtaccocctgatgcaaaactgaggcaggtcctctgtgacgat
Y I D D P C S A T Y P L M Q K L R Q V L V D D
gcgctggagcagctcagccgggagaagaaccaccgcaacctcacttccaagaagttgggcttccag
A L D D V D R E K N P S T S I F Q K I G A F E
gaggagctcaaggcactcctccgaaggagtcgagaacgcgagagctcagttcagagcgggaactc
E E L K A L L P K E V E N A R A Q F E S G N S
gcgatcctaacaagatcaggggtcaggtcgtaccattgtacaggtctgtaggggaagagctcgg
A I A N K I R G C R S Y P L Y R F V R E E L G
acoggtttctcaggggagaaggtcggctcggcggcggagactttgatctgggttctccgcaatg
T G L L T G E K V G S P G E D F D L V F S A M
tgcagggcgaagctgatcacttctgctggagcttggaggactggaggtgctcctcctccatc
C E G K L I D P L L E C L R D W D G A P L P I
tgtag
C Stop

```

図-4 *ErPALC* の塩基配列ならびに予想されるアミノ酸配列

- を含む網掛け 活性中心
- MIO           ドメイン
- 網掛け文字    活性に関わる重要なアミノ酸

Fig.4 A base sequence and a predicted amino-acid sequence of *ErPALC*

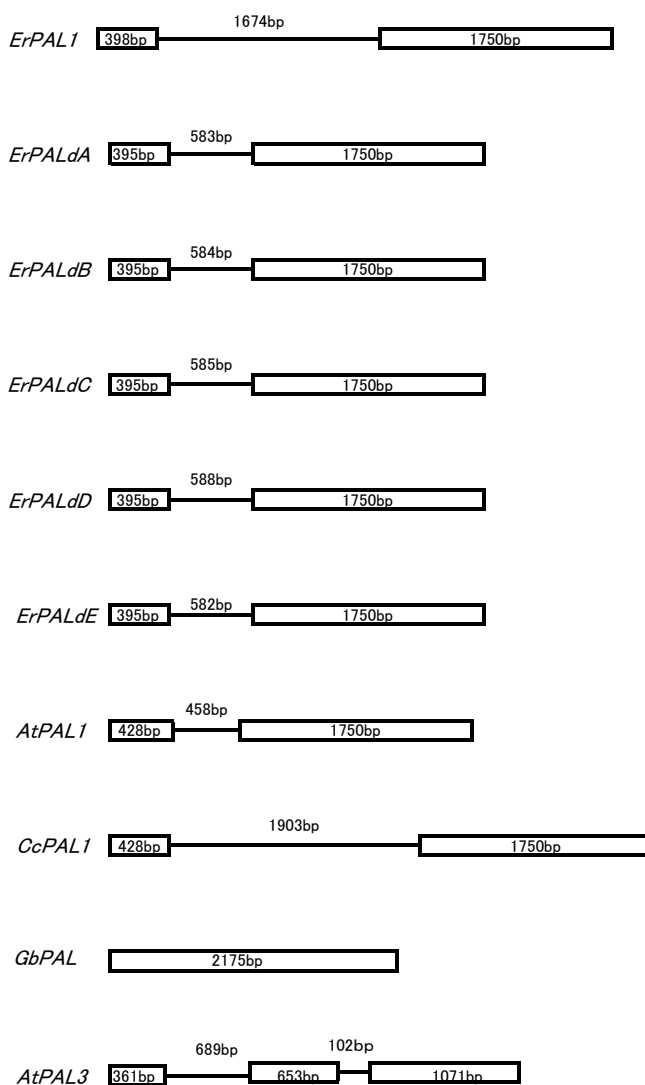


図-5 *E.robusta* と他植物における PAL 遺伝子の構造の比較  
 PAL 名称は本文に準ずる。□：エキソン —：イントロン  
 Fig.5 Structure of PAL genes of *E. robusta* and other plants

ErPALdA	RTKGGALQTELIRFLNAGIFGNGTESCHMLPHSATRAAMLVRIINTLLQGYSGIRFEILE	178
ErPALdB	RTKGGALQTELIRFLNAGIFGNGTESCHMLPHSATRAAMLVRIINTLLQGYSGIRFEILE	178
ErPALdC	RTKGGALQTELIRFLNAGIFGNGTESCHMLPHSATRAAMLVRIINTLLQGYSGIRFEILE	178
ErPALdD	RTKGGALQTELIRFLNAGIFGNGTESCHVLPHSATRAAMLVRIINTLLQGYSGIRFEILE	178
ErPALdE	RTKGGALQTELIRFLNAGIFGNGTESCHVLPHSATRAAMLVRIINTLLQGYSGIRFEILE	178
ErPALA	RTKGGALQRELIRFLNAGIFGNGTESCHTLPHSATRAAMLVRIINTLLQGYSGIRFEILE	178
ErPALB	RTKGGALQRELIRFLNAGIFGNGTESCHTLPHSATRAAMLVRIINTLLQGYSGIRFEILE	178
ErPALC	RTKGGALQRELIRFLNAGIFGNGTESCHTLPHSATRAAMLVRIINTLLQGYSGIRFEILE	178
ErPALD	RTKGGALQRELIRFLNAGIFGNGTESCHTLPHSATRAAMLVRIINTLLQGYSGIRFEILE	178
EgrPAL5	RTKGGALQTELIRFLNAGIFGNGTESCHVLPHSATRAAMLVRIINTLLQGYSGIRFEILE	178
EgrPAL6	RTKGGALQTELIRFLNAGIFGNGTESCHVLPHSATRAAMLVRIINTLLQGYSGIRFEILE	178
ErPAL1	RTKGGALQKELIRFLNAGIFGNGTESCHTLPOSSTRAAMLVRVNTLLQGYSGIRFEILE	179
EgrPAL9	RTKGGALQKELIRFLNAGIFGNGTESCHTLPOSSTRAAMLVRVNTLLQGYSGIRFEILE	179
***** **.*:*****:*****		
ErPALdA	TMAKLLNRNITPCLPLRGTVTASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPNGESLNAVEAFRL	238
ErPALdB	TMAKLLNRNITPCLPLRGTVTASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPNGESLNAVEAFRL	238
ErPALdC	TMAKLLNRNITPCLPLRGTVTASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPNGESLNAVEAFRL	238
ErPALdD	TMAKLLNRNITPCLPLRGTVTASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPNGESLNAVEAFRL	238
ErPALdE	TMAKLLNRNITPCLPLRGTVTASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPNGESLNAVEAFRL	238
ErPALA	TMAKLLNRNITPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPNGESLNAVEAFRL	238
ErPALB	TVAKLLNRNITPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPNGESLNAVEAFRL	238
ErPALC	TMAKLLNRNITPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPNGESLNAVEAFRL	238
ErPALD	TMAKLLNRNITPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPNGESLNAVEAFRL	238
EgrPAL5	TMAKLLNRNITPCLPLRGTVTASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPNGESLNAVEAFRL	238
EgrPAL6	TMAKLLNRNITPCLPLRGTVTASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPNGESLNAVEAFRL	238
ErPAL1	AITKFLNHNITPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPDGKSLDAVEAFRL	239
EgrPAL9	AITKFLNHNITPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPDGKSLDAVEAFRL	239
:.*:**:*****:*****:*****:*****:*****		

図-6 ユーカリ PAL のアミノ酸配列アラインメント  
 (□を含む網掛け: 活性中心, □: MIO ドメイン,  
 網掛け文字: 活性に関わる重要なアミノ酸, \*: 一致した部位, :: 類似性のある部位)  
 ※アミノ酸配列は重要なアミノ酸残基付近を抜粋した

Fig.6 Multiple alignment analysis of PAL amino-acids sequences in *Eucalyptus* by Clustal W

*tremuloides*) では, PtmPAL1 は縮合型タンニンが蓄積する組織での発現量が高く, PtmPAL2 はリゲニン量の多い組織で発現が高くなる (KAO, 2002)。また *Populus trichocarpa* では 5 つの PAL が 2 つのグループに分けられ, そのうち 1 つのグループ (PtrPAL2, 4, 5) は木部での発現が高くなることが確認されている (SHI, 2013)。確かに図-7 から PtmPAL1 と PtrPAL1, 3 が, PtmPAL2 と PtrPAL2, 4, 5 が非常に近いところに分類されていることがわかる。このように働きが異なっているグループごとに分類されることがあるが, 今回 *E. robusta* から得られた PAL はすべて Egr3-7 とクレードを形成した (図-7) ため, それぞれの機能は似通っていると予測できた。

*E. grandis* には EgrPAL1, 2, 8 (MYBURG, 2014) のように, ErPAL1 や今回解析された新たな PAL のいずれとも類似性が低い PAL が存在している。*E. robusta* においても ErPAL1 様ならびに新たな PAL と異なる PAL が複数存在していることが予想される。系統的な議論を行うにはさらなる情報の蓄積が望まれる。

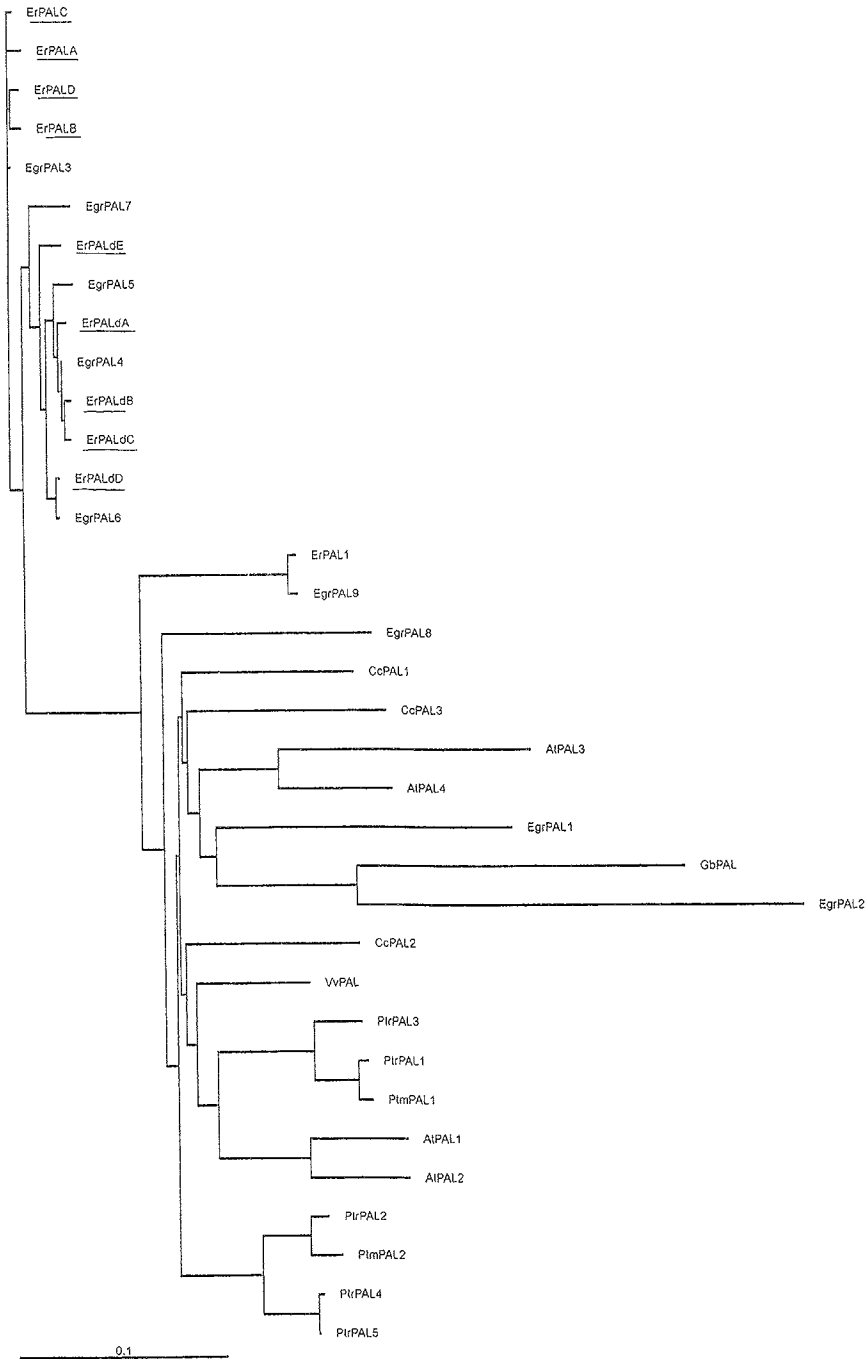


図-7 PAL のアミノ酸配列を用いて作成した系統樹  
 図中の略語は以下の通りである。その他は本文中の表記に従った。かっこ内は accession No. である。

Vv : *Vitis vinifera* VvPAL (ABN67591)

Fig.7 Phylogenetic tree showing the relationship of PAL or PAL-like amino-acids

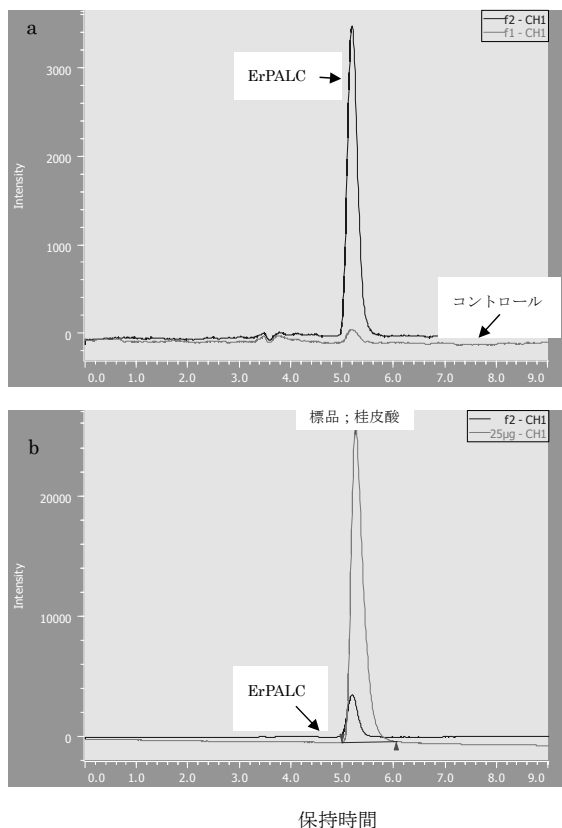


図-8 HPLC 分析による PAL 活性の検出  
 a : ErPALC 組換えタンパク質を発現させた粗酵素液の PAL 活性  
 b : 標品; 桂皮酸 (25ng) との保持時間の一致

Fig.8 Detection of PAL activity by HPLC systems

### 3.2.5 酵素発現

ErPALA-D については大腸菌を用いたタンパク質の発現を試みた。それぞれの発現ベクターを有した大腸菌培養粗抽出液を、分光光度計を用いた PAL 活性法に供して活性の見られた ErPALC と ErPALD については、引き続き His-tag カラム精製を行ってみた。しかし今回用いた大腸菌発現系では、試みた His-tag 法で完全に発現タンパク質を精製することはできなかった。そこで粗酵素液レベルのまま HPLC による PAL 活性を測定してみたところ、ErPALC 組換えタンパク質を発現させた大腸菌カラムフラクション粗抽出液 (図-8) では桂皮酸の生成を確認することができた。ErPAL 酵素の発現と精製ならびに酵素機能の解析に関しては、さらなる検討が必要である。

## 要旨

フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) は、フェノール性二次代謝物生成経路の初発酵素であり、ユーカリにおいても成長・防御に対して重要な役割を担っていると考えられる。*Eucalyptus robusta* (*Er*) 培養細胞を用いて、PCR、TA クローニング、タンパク質発現系を利用した手法を駆使して新規の PAL 遺伝子をクローニングすることにした。ゲノム DNA からは、5つの PAL と考えられる遺伝子の全配列を明らかにした。これらの塩基配列は1イントロン2エキソンの構造を有し、イントロンの長さは異なっていたが、エキソンの長さは全て2145bp (714アミノ酸をコード) であった。mRNA から調製したcDNA からは、4つの PAL と考える遺伝子の全配列 (2145bp) を明らかにした。既にクローニングされている *ErPAL1* との相同性は80%以上だが、これら9つの配列は互いに96-99%と非常に高い相同性を有していた。9ついずれの予想されるアミノ酸配列には PAL 遺伝子の活性部位と保存性の高いアミノ酸残基が存在した。酵素発現を試みたところ、粗酵素レベルで PAL 活性を確認できたものがみられた。機能解析ならびに酵素精製にはさらなる検討が必要である。

**キーワード** : *Eucalyptus robusta* ・ フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) ・ PCR ・ クローニング

## 引用文献

- AKIMOTO, S., ISHINO, T., TERADA, T., SAMEJIMA, M., and KAMODA, S. (2013) A phenylalanine ammonia-lyase gene (*ErPAL1*) from *Eucalyptus robusta*: molecular cloning, expression and characterization. *Bull. Univ. of Tokyo For.* 128:121-137.
- ALUNNI, S., CIPICIANI, A., FIORONI, G., and OTTAVI, L. (2003) Mechanisms of inhibition of phenylalanine ammonia-lyase by phenol inhibitors and phenol/ glycine synergistic inhibitors. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 412(2): 170-175.
- ARNOUS, A., MAKRISS, D., and KEFALAS, P. (2002) Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *Journal of Food Composition and Analysis* 15(6):655-665.
- CAROCHA, V., SOLER, M., HEFER, C., CASSAN-WANG, H., FEVEREIRO, P., MYBURG, A.A., PAIVA, J.A., and GRIMA-PETTENATI, J. (2015) Genome-wide analysis of the lignin toolbox of *Eucalyptus grandis*. *New Phytologist* 206 : 1297-1313.
- FOLIN, O., and DENIS, W. (1915) A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. *Journal of Biological Chemistry* 22(2):305-308.
- HIRAKAWA, H., NAKAMURA, Y., KANEKO, T., ISOBE, S., SAKAI, H., KATO, T., HIBINO, T., SASAMOTO, S., WATANABE, A., YAMADA, M., NAKAYAMA, S., FUJISHIRO, T., KISHIDA, Y., KOHARA, M., TABATA, S., and SATO, S. (2011) Survey of the genetic information carried in the genome of *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Biotechnology* 28(5):471-480.
- HOLMES, D. S., and QUIGLEY, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry* 114:193-197.
- JOOS, H., and HAHLBROCK, K. (1992) Phenylalanine ammonia-lyase in potato (*Solanum tuberosum* L) - Genomic complexity, structural Comparison of 2 selected genes and modes of expression. *European Journal of Biochemistry*, 204(2):621-629.
- Kao, Y., HARDING, S., and TSAI, C. (2002) Differential expression of two distinct phenylalanine ammonia-lyase genes in condensed tannin-accumulating and lignifying cells of quaking aspen. *Plant*

- Physiology* 130(2):796-807.
- LEPELLEY, M., MAHESH, V., MCCARTHY, J., RIGOREAU, M., CROUZILLAT, D., CHABRILLANGE, N., DE KOCHKO, A., and CAMPA, C. (2012) . Characterization, high-resolution mapping and differential expression of three homologous PAL genes in *Coffea canephora* Pierre (Rubiaceae). *Planta* 236(1): 313-326.
- LORKOVIC, Z., KIRK, D., LAMBERMON, M., and FILIPOWICZ, W. (2000) Pre-mRNA splicing in higher plants. *Trends in plant science* 5(4):160-167.
- MYBURG, A.A., GRATTAPAGLIA, D., TUSKAN, G.A., HELLSTEN, U., HAYES, R.D., GRIMWOOD, J., JENKINS, J., LINDQUIST, E., TICE, H., BAUER, D., GOODSTEIN, D.M., DUBCHAK, I., POLIAKOV, A., MIZRACHI, E., KULLAN, A.R.K., HUSSEY, S.G., PINARD, D., VAN DER MERWE, K., SINGH, P., VAN JAARSVELD, I., SILVA-JUNIOR, O.B., TOGAWA, R.C., PAPPAS, M.R., FARIA, D.A., SANSALONI, C.P., PETROLI, C.D., YANG, X., RANJAN, P., TSCHAPLINSKI, T.J., YE, C., LI, T., STERCK, L., VANNESTE, K., MURAT, F., SOLER, M., CLEMENTE, H.S., SAIDI, N., CASSAN-WANG, H., DUNAND, C., HEFER, C.A., BORNBERG-BAUER, E., KERSTING, A.R., Vining, K., AMARASINGHE, V., RANIK, M., NAITHANI, S., ELSEY, J., BOYD, A.E., LISTON, A., SPATAFORA, J.W., DHARMWARDHANA, P., RAJA, R., SULLIVAN, C., ROMANEL, E., ALVES-FERREIRA, M., LHEIM, C.K., FOLEY, W., CAROCHA, V., PAIVA, J., KUDRNA, D., BROMMONSCHENKEL, S.H., PASQUALI, G., BYRNE, M., RIGAUULT, P., TIBBITS, J., SPOKEVICIUS, A., JONES, R.C., STEANE, D.A., VAILLANCOURT, R.E., POTTS, B.M., JOUBERT, F., BARRY, K., PAPPAS, G.J., JR., STRAUSS, S.H., JAISWAL, P., GRIMA-PETTENATI, J., SALSE, J., DE PEER, Y.V., ROKHSAR, D.S., and SCHMUTZ, J. (2014) The genome of *Eucalyptus grandis*. *Nature* 510(7505):356-362.
- OLSEN, K.M., LEA, U.S., SLIMESTAD, R., VERHEUL, M., and LILLO, C. (2008) Differential expression of four *Arabidopsis* PAL genes; PAL1 and PAL2 have functional specialization in abiotic environmental-triggered flavonoid synthesis. *Journal of Plant Physiology* 165(14):1491-1499.
- REICHERT, I.R., HE, X., and DIXON, R. A. (2009) Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) from tobacco (*Nicotiana tabacum*): characterization of four tobacco PAL genes and active heterotetrameric enzymes. *Biochem. J.* 424(2):233-242
- SHANG, Q., LI, L., and DONG, C. (2012) Multiple tandem duplication of the phenylalanine ammonia-lyase genes in *Cucumis sativus* L. *Planta* 236(4):1093-1105.
- SHI, R., SHUFORD, C.M., WANG, J.P., SUN, Y., YANG, Z., CHEN, H., TUNLAYA-ANUKIT, S., LI, Q., LIU, J., MUDDIMAN, D.C., SEDEROFF, R.R., and CHIANG, V.L. (2013) Regulation of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) gene family in wood forming tissue of *Populus trichocarpa*. *Planta* 238(3):487-497.
- WANNER, L., LI, G., WARE, D., SOMSSICH, I., and DAVIS, K. (1995) The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 27(2):327-338.
- WHETTEN, R. and SEDEROFF, R., (1992) Phenylalanine ammonia-lyase from loblolly-pine - Purification of the enzyme and isolation of complementary-DNA clones. *Plant Physiology*, 98(1), pp. 380-386.
- XU, F., CAI, R., CHENG, S., DU, H., WANG, Y. and CHENG, S. (2008). Molecular cloning, characterization and expression of phenylalanine ammonia-lyase gene from *Ginkgo biloba*. *African Journal of Biotechnology* 7(6): 721-729.
- 秋元真也 (2012a) ユーカリ属樹木由来のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ遺伝子の解析 . 東京大学修士論文 , 55pp.
- 秋元真也・石野貴久・寺田珠実・鯨島正浩・鴨田重裕 (2012b) ユーカリのフェノール性成分とフェニルアラニンアンモニアリアーゼの遺伝子解析 . 東京大学農学部演習林報告 127 : 35-44.
- 植木悠貴 (2015) *Eucalyptus robusta* におけるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ遺伝子の解析 . 東京大学修士論文 , 56pp.
- 中村元 (2008) 植林ビジネスとバイオ燃料 .158pp, 株式会社 日本林業調査会 , 東京 .
- 西村弘行 (1987) 未来の生物資源ユーカリ - そのバイオテクノロジーとバイオサイエンス .274PP, 株式会社 内田老鶴圃 , 東京 .

(2015年8月21日受付)

(2016年3月16日受理)



### Summary

Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) is the first enzyme of phenolics (secondary metabolites) biosynthesis. So it may play an important role during growth and in the defense mechanism in eucalypts. Using PCR, TA cloning, and protein expression technologies, five of the *PAL*-like genes were cloned from genomic DNA of *Eucalyptus robusta* (*Er*) suspension cultured cells, and all new genes. These base sequences consisted of an intron (various sizes) and two exons (same sizes, first: 395 bp + second: 1750 bp = 2145 bp). This was a typical characteristic in plant PAL genes. Also four of the *PAL*-like genes were cloned from synthesized cDNA using mRNA of *Er* cells. The full-length sequences contained 2145bp ORF encoding 714 amino-acid polypeptides. Sequence alignment indicated nine *PAL*-like genes shared more than 80% identity with *ErPAL1*, while these nine sequences possessed 96-99% and very high homology with each other. Predicted PAL-like sequences contained active site motives and some well conserved amino-acid residues. Although new recombinant ErPAL proteins were not purified this time, it was possible to confirm coarse enzyme activities. Further consideration is necessary for enzyme purification and functional analysis.

**Keywords :** *Eucalyptus robusta*, Phenylalanine ammonia-lyase (PAL), PCR, molecular cloning