

Eucalyptus saligna の葉に含まれるフェノール性成分と

その生合成に関わる PAL 酵素の解析

稲垣怜那*・寺田珠実*・井上広喜**・鴨田重裕**・鮫島正浩*

Analysis of phenolics contents and phenolics biosynthesis-related PAL in *Eucalyptus saligna* leaves

Reina INAGAKI*, Tamami TERADA*, Hiroki INOUE**, Shigehiro KAMODA**
and Masahiro SAMEJIMA*

1. 緒言

ユーカリ（英名 eucalypt(s)）はフトモモ科（Myrtaceae）に属する早生の常緑広葉樹で、700 種ほどが同定されている。適応適地の樹種選抜に優れており、世界的に重要な樹木である。数多く存在するユーカリ種のうち、*Eucalyptus saligna* (*Es*) はシドニー近郊に自生し 50 m ほどにもなる高木樹種で、高比重・高強度で知られており、1970 年代から日本の製紙メーカー各社により海外における植林木としての検討が行われてきた¹⁾。現在では、オーストラリアを中心に、建材やパネル材などとして多目的に利用されている種である²⁾。日本国内の *Es* については、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（以降樹芸研究所と記述）において、オーストラリア連邦科学産業研究機構（CSIRO）の Australian Tree Seed Centre（ATSC）より入手した種子から育成したところ、3 年間で 10 m 以上伸長したという特徴がある。また *Es* は、CSIRO によって産地別に系統番号が与えられている（ATSC seed database）ため、同種間でも複数の系統のものが存在する。それらの性質の相違等詳細は報告されていない。現在、樹芸研究所では、*Es* の 20483、20675、20835 の 3 つの系統における材質や加工特性、さらに成分についての研究が進められているところである。今後は日本国内において材としての利用が検討されると考えられる。

我々はこれまで、*Es* が材として利用される際に不要となる葉について、新たな資源としての利用を目指し、*Es* の葉に含まれるフェノール性成分に関する研究を行ってきた。*Es* の苗木の葉に含まれるフェノール性成分の分析を行ったところ葉には乾重量当たり 15-20% のフェノール性成分が含まれており、系統によってその組成は異なっていることを明らかにした³⁾。主成分は没食子酸、没食子酸メチルおよびその配糖体類であり、それらは全フェノール量の 80% 以上を占めていた。そのほか、カテキン、クロロゲン酸、エラグ酸、ケルセチン、ケンフェロールなど、有用性の期待される成分が多数検出され、*Es* 葉が資源として利用できる可能性が示された³⁾。

多くのフェノール性成分の合成はフェニルプロパノイド経路を通して行われる。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

* 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

** 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

フェニルアラニンを脱アミノ化し、桂皮酸を生成する反応に関わる重要な酵素である⁴⁾ (Fig. 1)。これまで PAL については、さまざまな植物で研究されてきており、例えば *Arabidopsis thaliana* のもつ PAL には *AtPAL1*, *AtPAL2*, *AtPAL3*, *AtPAL4* の4つが存在し、それぞれが成分の合成や刺激に対する反応など異なる機能を有していることが明らかにされている⁵⁾。また、キュウリ (*Cucumis sativus* L.) には PAL 様遺伝子配列が全部で 11 存在するが、そのうち実際に活性を示すのは7つであり、残り4つは偽遺伝子であることがわかっている⁶⁾。

一方で、ユーカリが世界的に重要な樹木であるにもかかわらず、ユーカリのもつ PAL については未解明な部分が多い。我々は以前から *E. robusta* のもつ PAL に関する研究を行ってきており、複数の PAL および PAL 様遺伝子配列を発見している⁷⁻⁹⁾。さらに2014年には *E. grandis* の全ゲノム情報が開示され、そのゲノム上に全9つの PAL 様遺伝子配列 (*EgrPAL1-9*) が存在す

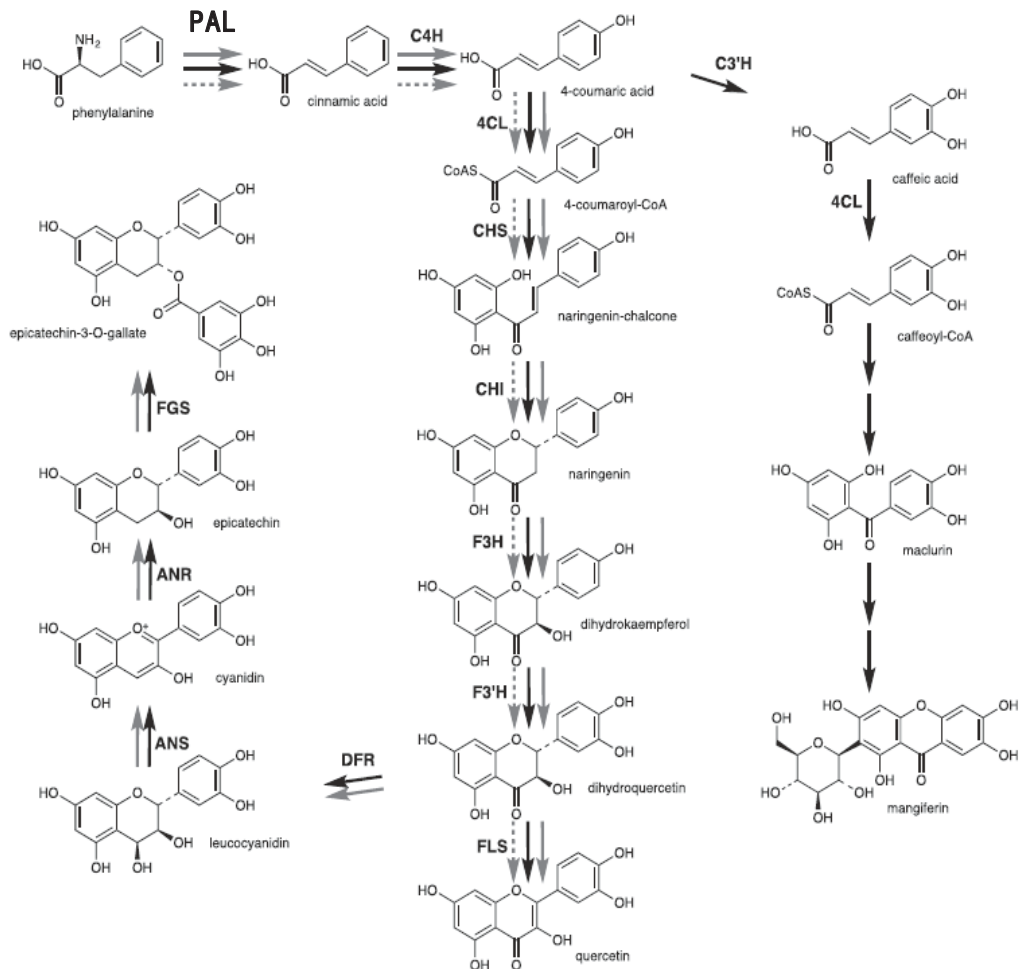


図1. 主なフェノール性成分の生合成経路

Fig. 1. Biosynthetic pathway of major phenolic components

出典: Hoang, V. L. T. *et al.*⁴⁾ による図を一部変更

ることが明らかにされた¹⁰⁾ (Fig. 2)。現在、この *E. grandis* のゲノム情報をもとに活発な研究がなされており、*EgrPAL3* および *EgrPAL9* は Lignification (木質化) において重要な役割を果たしている可能性が報告されている¹¹⁾ (Fig. 3)。*EgrPAL1*, *EgrPAL2*, *EgrPAL8* については、詳しいはたらきはまだまだよくわかっていない。

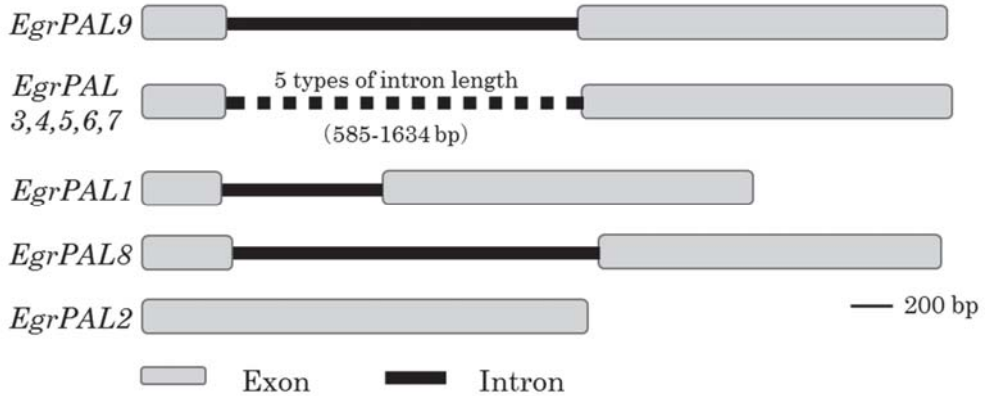


図2. *E. grandis* のゲノム上に存在する PAL
Fig. 2. PAL present on the genomic DNA of *E. grandis*

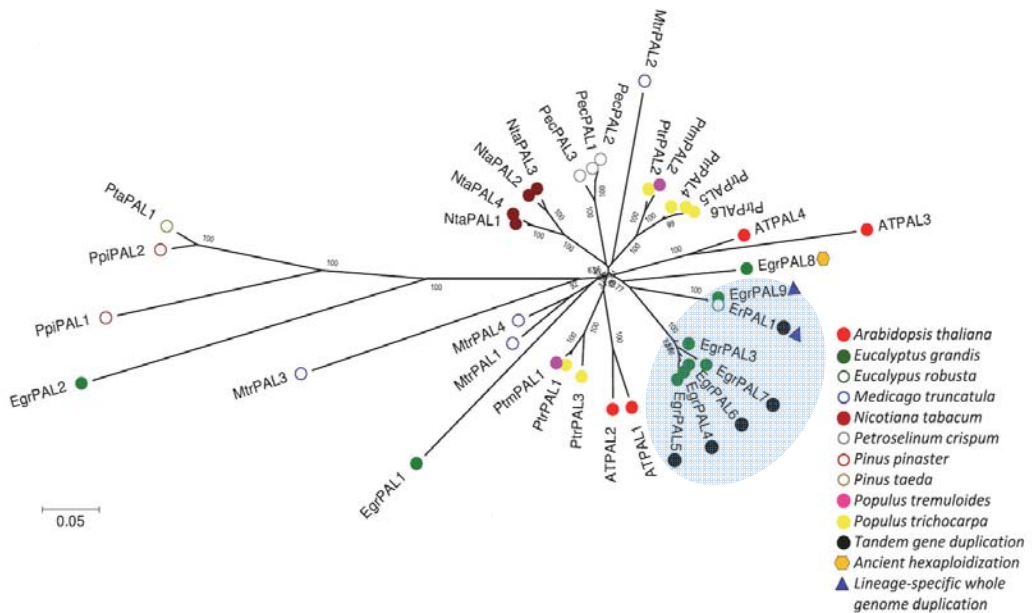


図3. *E. grandis* のもつ PAL と既知の植物のもつ PAL との系統樹
Fig. 3. Phylogenetic tree between PAL of *E. grandis* and PAL of known plant

● Lignification に関わるとされる PAL
出典: Carocha, V. *et al.*¹¹⁾ による図を一部変更

本研究では、*Es* が材として利用する際に捨てられてしまう葉に含まれる有用なフェノール性成分の効率的な生産を目指し、入手可能な *Es* の 3 系統の個体に関して、葉と葉から誘導した培養細胞のフェノール性成分の分析を行った。系統番号間でのフェノール性成分の組成を比較し、成長段階における成分組成の変化や特徴について考察した。また、*Es* の苗木の葉に多量かつ多様なフェノール性成分が含まれていたことから、それらフェノール性成分の生合成に関わるキエンザイム PAL に着目した。以前行った研究より、*Es* にも PAL 様遺伝子が複数存在する¹²⁾ と推測され、さらに、系統間で成分組成が異なることと関連して、系統によって PAL の遺伝子配列や働きにも違いがあるのではないかと考えた。そこで、本研究では、3 系統の *Es* の苗木の葉から抽出したゲノム DNA および mRNA から、フェノール性成分の生合成に関わる可能性のある PAL 様遺伝子配列のクローニングを行い、3 系統それぞれの PAL 遺伝子に関する情報を得て、フェノール性成分との関連について情報を得ることを目的とした。

2. 実験

2.1 実験材料

2.1.1 原植物について

2016 年 8 月、樹芸研究所で育成されている系統番号 20483、20675、20835 の 3 系統の *Es* の若木（植栽後 2.5-3 年、樹高約 10 m）から樹高別に葉を採取し、抽出用サンプルとして用いた。葉の採取時の詳細な個体情報は Table 1 に示した。

DNA 抽出および mRNA の抽出には、同じく系統番号 20835、20675、20483 の 3 系統の *Es* の苗木（樹高約 30 cm）の葉を用いた。

表 1. フェノール性成分の抽出に用いた *Es* 個体の情報

Table 1. Information on *Es* individual used for extraction of phenolic component

Strain	20483			20675			20835		
	①	②	③	①	②	③	①	②	③
Individual number	24-1	21-7	2-1	25-4	22-7	3-8	23-6	20-7	3-5
Total height* ¹	822	1203	1180	1232	1188	1024	1134	1150	1166
Leaf height from the ground* ¹ (upper)	822	1203	1180	1232	1188	1024	1134	1150	1166
Leaf height from the ground* ¹ (middle)	680	740	769	492	809	593	620	710	783
Leaf height from the ground* ¹ (lower)	395	160	320	237	507	240	290	297	367
Planted time* ²	A	A	B	A	A	B	A	A	B

*1：高さの単位はすべて cm

*2：A：2013/12/17（採取時点で約 2.5 年生）、B：2013/6/12（採取時点で約 3 年生）

2.1.2 培養細胞の誘導

樹高約 30 cm の 3 系統 20483, 20675, 20835 の *Es* の苗木の葉を採取し、適当な大きさに刻み、LS¹³⁾ 改変培地 (Table S1) に置いて培養細胞を誘導した。これを約 1 カ月ごとに継代し、培養 910-930 日目にあたるサンプルを材料として用いた。

附表 1. *Es* 培養細胞の誘導に用いた LS 改変培地組成

Table S1. LS modified medium composition used for induction of *Es* cultured cells

Composition in LS modified medium (mg/L)	pH5.8-6.0
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
KH ₂ PO ₄	170
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3
H ₃ PO ₃	6.2
ZnSO ₄ · 4H ₂ O	8.6
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025
Na ₂ EDTA	38
FeSO ₄ · 7H ₂ O	28
Sucrose	30000
Inositol	100
Thiamine hydrochloride	0.1
2,4-dichlorophenoxyacetic acid	0.5
Kinetin	0.4

2.2 フェノール性成分の分析

2.2.1 80% MeOH による抽出

2.1.2 で誘導した培養細胞を適量採取し、生重量を測定した。また、2.1.1 の葉に関しては、地面からの高さを上・中・下の 3 つのグループに分け、それぞれの高さの葉を十数枚ずつ採取して生重量を測定し、液体窒素で粗くすりつぶした。これらの培養細胞と葉について、生重量 100 mg に対して 3 mL の 80%メタノールを加え、浸漬した。浸漬を開始した同日に、抽出に用いたサンプルと同じ培養細胞と葉の一部をとり、生重量を測定したうえで、乾燥機で乾燥させ絶乾重量を測定し、含水率を算出した。

2.2.2 フェノール類の比色定量

2.2.1 で浸漬した培養細胞、葉それぞれについて浸漬 3 日目の抽出液を定量に用いた。吸引ろ過して得たサンプルを水で 50 倍希釈し、そこから 500 μ L 取り出して Folin-Denis 法¹⁴⁾を用いて、既報に従い³⁾、フェノールの定量を行った。

2.2.3 フラバノール類の比色定量

2.2.2 で吸引ろ過して得たサンプルを、DMACA 法¹⁵⁾に基づいて分析し³⁾、フラバノール定量を行った。

2.2.4 HPLC による分析

2.2.1 で得た葉および培養細胞の抽出液から 200 μ L とり、11000 rpm で 10 分間遠心した。上澄みを C18 プレカラムに通し、検出器を UV とする高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に 1 μ L インジェクトし、分析を行った。溶離液組成と検出波長の条件は Table S2 に示した。

葉の抽出液に関しては配糖体の存在を確認するため、マイクロチューブ内で抽出液と濃塩酸を塩酸濃度 0.48 M になるよう混合し、100 $^{\circ}$ C の恒温槽中で 2 時間加水分解を行った。これは没食子酸類の配糖体の存在確認に供した。さらに、これとは別にマイクロチューブ内で、抽出液と濃塩酸を塩酸濃度 0.06 M になるよう混合し、10 $^{\circ}$ C の恒温槽中で 30 分間加水分解を行った。これはフラボノール類の配糖体の存在確認に供した。また、各条件下において主要なピークの UV スペクトルを 200-400 nm の範囲で観察した。得られた UV スペクトルを、標品の UV スペクトルと各分析条件下における保持時間と比較して、物質を同定した。さらに、濃度既知の標品とピーク面積を比較することで、同定した化合物の定量を行った。HPLC のその他条件に関しては、以下の通りである。

機種：AS-2057Plus (JASCO 社)

カラム：CAPCELL PAK C₁₈ MGII 150 mm \times ϕ 4.6 mm (資生堂)

流速：0.5 mL/min

附表 2. HPLC の分析条件
Table S2. Analytical conditions of HPLC

	Eluent composition (0.005%TFA : MeOH)	Objective detected compounds	Detection wavelength (UV)
Condition①	80 : 20	Gallic acid, Flavanols and their derivatives	280 nm
Condition②	62 : 38	Gallic acid, Methyl gallate, Chrologenic acid and their derivatives	280 nm
Condition③	30 : 70	Flavonols and Ellagic acid	365 nm

2.3 *Es* 由来 PAL 様遺伝子配列 (*EsPAL*) のクローニング

2.3.1 ゲノム DNA の抽出

Es の系統番号 20835, 20675, 20483 の 2.1.1 の苗木の葉を約 100 mg ずつ採取した。これを、液体窒素を用いて粉末状にすりつぶし、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) により、付属のプロトコールに従って DNA を抽出した。

2.3.2 mRNA の抽出

2.1.1 の 3 系統の *Es* の苗木から葉を約 100 mg ずつ採取し、液体窒素により粉末状にすりつぶした。ここから、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) により、付属のプロトコールに従って total RNA を抽出した。得られた total RNA から PolyATtract® mRNA Isolation Systems (Promega) により、付属のプロトコールに従って mRNA を抽出した。さらに、得られた mRNA から PrimeScript™ Double Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) により付属のプロトコールに従って 2 本鎖 cDNA を合成した。

2.3.3 フェノール性成分の抽出および分析

3 系統の *Es* の、mRNA および DNA の抽出に用いた苗木と同じ個体から適量の葉を採取した。2.2 フェノール性成分の分析と同様の手順でフェノール性成分を抽出し、比色分析および HPLC を用いた定量を行った。

2.3.4 PAL の増幅と In-Fusion 反応

2.3.1 および 2.3.2 で 3 系統の *Es* の cDNA およびゲノム DNA をテンプレートにして、2014 年にゲノム情報が開示された *E. grandis* の配列情報¹⁰ から設計した 5 種類のプライマーセット (Table 2) を用いて PCR を行った。各プライマーセットに対する PCR の反応条件は Table S3 の通りである。なお、PCR 反応に用いた DNA ポリメラーゼは、反応条件の違いなどから *EsPAL1*, *EsPAL2*, *EsPAL3* では Ex Taq®HS (TaKaRa), *EsPAL4*, *EsPAL5* では KOD-Plus-Neo (TOYOBO) を用いた。PCR 混合溶液の組成は Table S4 に示す。

PCR 後、電気泳動によって得られた PCR 産物の大きさを確認した後、NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (TaKaRa) を使って精製した。精製後のサンプルをテンプレートにして、In-Fusion 反応を行うために設計したプライマーセット (Table 3) を用いて PCR 反応を行った。溶液の組成、および反応時のプログラムは Table S3 に示した通りである。

得られた PCR 産物について、電気泳動によりバンドの大きさを確認した後、NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (TaKaRa) を使って精製しユーロフィンジェノミクス株式会社に委託してシーケンス反応を行った。In-Fusion 反応に使用される 15 塩基の領域が正しく付加されていること、および目的とした配列が増幅されていることを確認した。

表 2. *E. grandis* のゲノム配列情報から設計した 5 組のプライマー配列Table 2. Five pairs of primer sequences designed from *E. grandis* genomic sequence information

	Forward Primer Sequence (5' to 3')	Reverse Primer Sequence (5' to 3')
<i>EsPAL1</i>	EgPAL1_ofxx CGCTATCGTTAACGTACACACGTTC	EgPAL1_orx CTTGGCAAGTAAACGGAAAGGGAAAAAG
<i>EsPAL2</i>	EgPAL2_ofx GCTCTGCAGAGGGAGCTCATAAG	EgPAL2_orx GAGGCAGTCTTCAGGATTTGGAAAAAG
<i>EsPAL3</i>	EgPAL3_ofx ATCTCGTTCCCGGAGTAACCG	EgPAL3_orx CCAATAGATTAAACAAGGACACATGGC
<i>EsPAL4</i>	EgPAL4_of2 GCCATTCTCCCTCGCTTTCTCGG	EgPAL4_or GCAAATTGCCATCCTCTTCTTAGGCAG
<i>EsPAL5</i>	EgPAL5_ofx2 CTCAAATCTTTAAGCTTTCCATCTTTGTAAC	EgPAL5_orx2 GACCTACTTCGAGAACCAGCAAG

附表 3. PCR 反応条件

Table S3. Reaction conditions for PCR

	Normal PCR for DNA or cDNA sample	For Preparation of In-Fusion Reaction Sample
<i>EsPAL1</i> Taq*	94°C for 2 min, (94°C for 30 sec, 60°C for 30 sec, 72°C 2min)×30 cycles, 72°C for 5 min, 4°C for ∞	
<i>EsPAL2</i> Taq*	94°C for 2 min, (94°C for 30 sec, 57.5°C for 30 sec, 72°C 2min)×30 cycles, 72°C for 5 min, 4°C for ∞	
<i>EsPAL3</i> Taq*	94°C for 2 min, (94°C for 30 sec, 57.5°C for 30 sec, 72°C 2min)×30 cycles, 72°C for 5 min, 4°C for ∞	
<i>EsPAL4</i> KOD*	94°C for 2 min, (98°C for 10 sec, 68°C 2min)×30 cycles, 68°C for 5 min, 4°C for ∞	94°C for 2 min, (98°C for 10 sec, 68°C 90 sec) ×20 cycles, 68°C for 5 min, 4°C for ∞
<i>EsPAL5</i> KOD*	94°C for 2 min, (98°C for 10 sec, 68°C 2min)×30 cycles, 68°C for 5 min, 4°C for ∞	94°C for 2 min, (98°C for 10 sec, 68°C 90 sec) ×20 cycles, 68°C for 5 min, 4°C for ∞

附表 4. PCR 混合溶液の組成 (1 本あたり)

Table S4. Composition of PCR mixed solution (per one)

(a) ポリメラーゼに Ex Taq® を使用した場合, (b) ポリメラーゼに KOD-Plus-Neo を使用した場合

(a)		(b)	
Water	12.3 μ L	Water	31.5 μ L
10 \times Ex Taq Buffer	2.0 μ L	10 \times Buffer	5.0 μ L
dNTP mix	1.6 μ L	dNTP mix	5.0 μ L
DMSO	1.0 μ L	MgSO ₄	3.0 μ L
Ex Taq	0.1 μ L	KOD plus Neo	1.0 μ L
Primer 1	1.0 μ L	Primer 1	1.5 μ L
Primer 2	1.0 μ L	Primer 2	1.5 μ L
Template	1.0 μ L	Template	1.5 μ L
Total	20.0 μ L	Total	50.0 μ L

表 3. In-Fusion 反応に用いたプライマー配列

Table 3. Primer sequence used for In-Fusion reaction

	Forward Primer Sequence (5' to 3')	Reverse Primer Sequence (5' to 3')
<i>EsPAL4</i>	EsPAL4_in_f	EsPAL4_in_r
	TAAGGCCTCTGTCGACATGGAAGTAGCG	CAGAATTTCGCAAGCTTGCAAATGGGAAGG
	GCGGCGG	GGGGTGCC
<i>EsPAL5</i>	EsPAL5_in_fff	EsPAL5_in_r
	TAAGGCCTCTGTCGACATGGCCGCCTGT	CAGAATTTCGCAAGCTTTGAACTGCAGTTC
	GTCGGAAATG	TTGAAGCATTGCATC

2.3.5 大腸菌の形質転換

2.3.4 で得られた精製済みの PCR 産物から 1.5 μ L をとり, pET6xHN-C (In-Fusion Ready) Expression Vector (Clontech) 1.0 μ L, 5 \times In-Fusion HD Enzyme Premix (Clontech) 2.0 μ L と 8 連チューブ内で混合し, サーマルサイクラーを用いて 50 $^{\circ}$ C で 15 分間反応を行った。反応後の溶液から 3.5 μ L をマイクロチューブにとり, そこへコンピテントセル *E. coli* BL21 (TaKaRa) を 50 μ L 加え, 氷中で 30 分間インキュベートした。その後, 42 $^{\circ}$ C の恒温槽に 60 秒間置きヒートショックを起こし, 続いて氷中で 2 分間冷却した。次に, あらかじめ 37 $^{\circ}$ C に保持しておいた SOC 培地を 490 μ L 加え, 37 $^{\circ}$ C の恒温槽で 1 時間前培養を行った。滅菌シャーレにアンピシリン 100 μ g/mL 入りの LB 培地をおよそ 20 mL ずつ流し込み乾燥させた後, その上から先ほど培養した DNA 溶液を 25-100 μ L ずつ撒いた。これらを 37 $^{\circ}$ C で一晩培養し, 翌朝得られたコロニーからボイル法で DNA を抽出し, 11000 rpm で 7 分間遠心を行った。遠心後のサンプルから上澄みを取り, pET6xHN-C (In-Fusion Ready) Expression Vector (Clontech) のクローニングサイトの上流と下流に位置するプライマーセットを設計し (Table 4) それを用いて PCR 反応を

行い、電気泳動によってインサート配列の大きさを確認した。PCRの反応条件はTable S3の*EsPAL4* (KOD) Normal PCR for DNA or cDNA sample の条件に準ずる。

表4. インサート配列のPCRに用いたプライマー配列
Table 4. Primer sequence used for PCR of insert sequence

Forward Primer Sequence (5' to 3')	Reverse Primer Sequence (5' to 3')
Inf_newF GTAGAGGATCGAGGTCTCGATCCC	Inf_R CCCTGGATGCTGTAGGCATAGG

2.3.6 酵素発現とHPLCを用いたPAL活性の測定

2.3.5で得られた組換え大腸菌のうち、cDNAから得た*EsPAL4*および*EsPAL5*様遺伝子配列をもつものについて、酵素発現を誘導し、粗酵素液におけるPAL活性の測定を行った。

*EsPAL4*様遺伝子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から、3系統それぞれ15コロニーずつ、計45個のコロニーをランダムに選び取った。さらに、20675系統のcDNAから得た、*EsPAL5*様遺伝子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から、26個のコロニーをランダムに選び取った。これらのコロニーをつついた爪楊枝を、オートクレーブ滅菌した5 mLのLB培地中に落とし、26.5°Cで一晩培養した。翌朝、フルグロースに達したサンプルから10 μ Lとり、新たに準備した5 mLのLB培地に添加した。37°Cで2.5-3時間培養しOD⁶⁰⁰ = 0.6付近になったことを確認し、終濃度が0.5 mMになるよう、各試験管に0.1 MのIPTGを25 μ Lずつ加えた。再び37°Cで培養し、発現を誘導した。2時間後、大腸菌をマイクロチューブに1.5 mLずつとり、11000 rpm、4°Cで10分間遠心分離した。上澄みを捨て、残った大腸菌ペレットに400 μ LのHisTALON xTractor Buffer (Clontech)と100 μ LのTricine-NaOH Buffer (pH8.8, 250 mM)を加え、10分間激しくボルテックスした。そこに、3 μ LのRecombinant DNase I (RNase-free) (TaKaRa)を加え、適時転倒混和させながら氷上で30分間インキュベートした。反応後の溶液を11000 rpmで4°C、10分間遠心分離し、得られた上澄みを粗酵素液とした。得られた粗酵素液をマイクロチューブに450 μ Lとり、基質として10 mg/mLのフェニルアラニン50 μ L加え、40°Cの恒温槽中でインキュベートした。1時間後、1.2 MのHClを100 μ L加えて反応を停止させた。反応後の溶液500 μ Lをマイクロチューブにとり、1 mLの酢酸エチルを加えて十分にボルテックスした。11000 rpmで5分間遠心分離を行い、得られた上澄み500 μ Lを新しいマイクロチューブにとって乾固させた。200 μ Lのメタノールに再溶解させ、11000 rpmで遠心分離を行い、上澄み120 μ LをHPLCのサンプルとした。これらの操作と並行し、インサート配列を有していない大腸菌についても同様に反応を行い、コントロールサンプルを作製した。得られたサンプルについて、HPLCを用いてUV280 nmで分析した。分析条件は以下の通りである。

溶離液組成：0.005%TFA 水：MeOH = 20：80

機種：AS-2057Plus (JASCO 社)

カラム：CAPCELL PAK C₁₈ MGII 150 mm × ϕ 4.6 mm (資生堂)

流速：0.5 mL/min

2.3.7 クローニングおよび配列解析

2.3.5 でインサート配列の大きさを確認した後、PAL 様遺伝子配列の組み込まれたベクターを有する大腸菌コロニーを爪楊枝でつつき、オートクレーブ滅菌した 2 mL の LB 培地中に落とした。これを 26.5℃ で 1 晩振とう培養し、OD⁶⁰⁰ = 0.8 以上になったことを確認してから、QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を使い、プロトコールに従ってプラスミドを抽出した。プラスミドをテンプレートにし、ユーロフィンジェノミクス株式会社のシーケンス解析サービスに委託して、その配列を決定した。シーケンス反応に用いたプライマーは、*E. grandis* のゲノム情報¹⁰をもとに設計した(Fig. 4 および Table 5)。クローニングした配列を Translate tool (<http://web.expasy.org/translate/>) に供して推定アミノ酸配列を決定した。得られた推定アミノ酸配列と、NCBI (National Center for Biotechnology Information) から取得した既知の植物のもつ PAL を DDBJ (DNA Data Bank of Japan) の ClustalW を用いて配列相同性およびマルチプルアラインメント解析を行った。これらを MEGA6 に供し、系統樹を作成した。

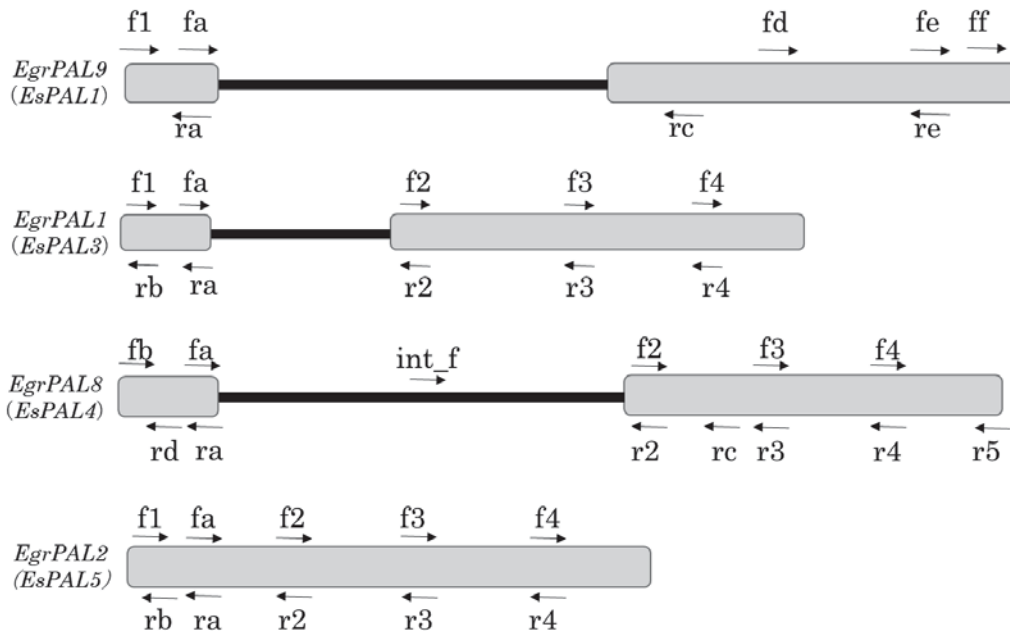


図 4. シーケンス反応に用いたプライマーの遺伝子配列上における位置

Fig. 4. The position on the gene sequence of the primer used for the sequence reaction

表 5. シーケンス反応に用いたプライマー配列
 Table 5. Primer sequence used for sequence reaction

	Primer Sequence (5' to 3')	
<i>EsPAL1</i>	fa	CGGTGCTTTGCAGAAGGAAC
	ra	GTTCCCTTCTGCAAAGCACCG
	f1	GCAACGGCCTTCACGGCCTC
	rc	ACCAAGTCGCCTGAGGCAGTG
	fd	CGACAACCGCTGATCGACG
	fe	GCAAGTCCTGGTCGACCAGG
	re	CCTGGTCGACCAGGACTTGC
	ff	CAGTTGCCGAAGGACGTCGAG
<i>EsPAL3</i>	fa	CGCAAGGGTGGTGTGGATG
	ra	CATCCAGCACCCCTTGGCG
	rb	CTAATGAGCTCCTTCTGGAG
	f1	ATGGCAGCTCGTCACGCAGAG
	f2	CCTCGGGAGATCTGTCCCG
	r2	CGGGACAAGATCTCCCGAGG
	f3	GGACACCGATTACCGTCGCC
	r3	GGCGACGGTAATCGGTGTCC
	f4	CATTGTGGAACGGAGAGAGC
	r4	GCTGTCTCCGTTGACAATG
<i>EsPAL4</i>	fa	CTCCAGAAGGAGCTCATCAG
	ra	CTGATGAGCTCCTTCTGGAG
	fb	CCACCTCGAGGAGGTGAAGC
	rc	GGTCAGTGAACCTTGGCTTCC
	rd	GCACATGCTCTCCATGATCCACTC
	f2	CTCGTCAACAGTGGCATCAC
	r2	GTGATGCCACTGTTGACGAG
	f3	GTTAGGTCCTCAGGTGGAAG
	r3	CTTCCACCTGAGGACCTAAC
	f4	GAAGAGCACGGTGAAGAACAC
	r4	GTGTTCTTCACCGTGCTCTTC
	r5	CTAGCAAATGGGAAGGGGGG
	int_f	CGTATGTATGCATATCTC
<i>EsPAL5</i>	fa	GTTGCTGAGACCATCAGCTG
	ra	CAGCTGATGGTCTCAGCAAC
	rb	ACTGGGACAACAGGCTCCTC
	f1	ATGGCCGCCTGTGTCGAAATG
	f2	CCTCGGGCGATCTCGTGCCG
	r2	CGGCACGAGATCGCCCGAGG
	f3	GCTTGGGCCGCAAGTCGAAG
	r3	CTTCGACTTGCGGCCAAGC
	f4	GAAGCGCTCGGTCTCCAAG
	r4	CTTGGAGGACCGAGCGCTTC

3. 結果および考察

3.1 フェノール性成分の分析

3.1.1 培養細胞の成分

培養細胞から得られた抽出液を、Table S2 で示した条件②および③で HPLC により分析し、フェノール性成分の詳しい組成について調べた。③の条件下では目立ったピークは観察できず、フラボノール類はほとんど含まれていないと考えられた。②の条件下で検出できたピークについて番号を与え (Fig. 5), UV スペクトルを観察し、標品の保持時間 (Rt: Retention time (分)) との比較によって各ピークに対応する化合物を同定した。Rt 3.52 の最も大きなピーク a はカテキン類および没食子酸類の配糖体, Rt 4.27 のピーク b は没食子酸, Rt 5.52, Rt 6.15 のピーク c は没食子酸メチルの配糖体, Rt 7.52 のピーク d は没食子酸メチル, と推測できた。その他の成分は同定できなかった。葉に比べて全フェノール量中の没食子酸メチルの割合が多かった。また、比色定量で得たフェノールおよびフラボノールの量は Table 6 に示したようになり、20483 系統に含まれるフェノール量だけがとくに多い結果になった。一方で、20483 系統のフラバノール量はほかの 2 系統よりも少なかった。20483 系統は、20675 系統や 20835 系統に比べて苗木においても 2-3 年生の若木においても、次の 3.1.2 に示すようにフラバノール量の割合が少ない傾向が見られたため、培養細胞でもその傾向が維持されていると考えられる。

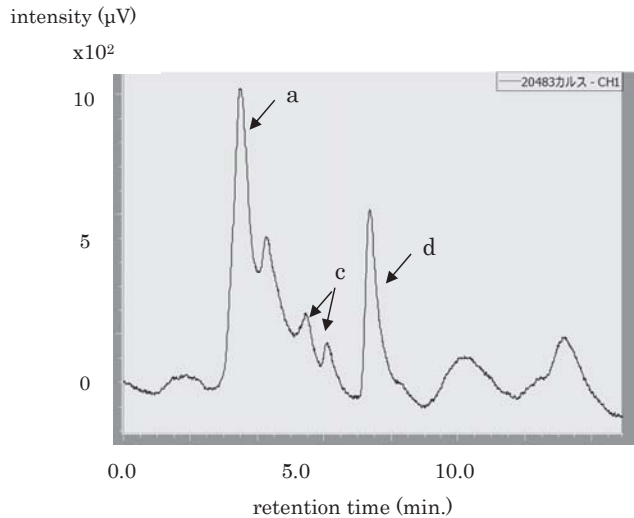


図 5. 条件② (メタノール 38% コンスタント) における *Es* 培養細胞の抽出液の HPLC (系統番号 20483)
 Fig. 5. HPLC (20483 strain) of extract solution of *Es* cultured cells under condition ② (methanol 38% constant)

ピーク番号 a: Rt3.48 カテキン類および没食子酸類の配糖体, b: Rt4.30 没食子酸,
 c: Rt5.47, 6.05 カテキン類とその配糖体, d: Rt7.67 没食子酸メチルまたはその配糖体
 * Rt (Retention time): 保持時間 (分)

表 6. 培養細胞に含まれるフェノール性成分量（比色定量）

Table 6. Amount of phenolic component contained in cultured cells (colorimetric determination)

	Phenolics	Flavanol
20483	2.99	0.10
20675	1.99	0.14
20835	1.92	0.14

値はすべて乾重量当たりの含有量（%）

3.1.2 成長段階における *Es* 葉の成分比較

観察された主要なピークに番号を与え、標品との保持時間およびUVスペクトルの比較によって、各ピークに対応する化合物を同定した (Fig. 6)。3種類いずれの系統番号においても、*Es* の葉からは没食子酸と没食子酸メチルおよびその配糖体、エラグ酸、フラボノールとしてケルセチン、ケンフェロール、カテキン類およびその配糖体、クロロゲン酸という多様なフェノール性成分の存在が確認できた。これらはすべて苗木の葉の分析時に検出した化合物^{3,12)}と一致しており、苗木と2-3年生の若木でそれぞれに特異的な成分の存在は見られなかった。今回用いた若木では、苗木と比べ、系統によらずフェノール性成分が乾重量当たり約5-10%減少していた (Table 7)。各成分が全体量に占める割合も苗木のときから変化しており、クロロゲン酸に関してはいずれの系統においても全フェノール量に占める割合が苗木より2-15%減少していることが確認できた (Fig. 7)。20835系統においては、苗木に比べて全フェノール量中のエラグ酸やフラボノールの量の割合に顕著な増加が見られた。3系統すべてにおいて、苗木のときと同様、没食子酸、没食子酸メチル、およびそれらの配糖体類が全フェノール量の80%以上を占めることがわかった。没食子酸およびカテキン類以外の化合物は培養細胞 (3.1.1) では検出できなかったものであり、今回検出できた没食子酸およびカテキン類以外の化合物は、葉に分化特異的なものであると考えられた。検出された成分のうち、カテキンに代表されるフラバノール類は健康維持に効果のある成分として注目されており^{16,17)}、ケルセチンやケンフェロールなどのフラボノール類は骨粗しょう症予防や抗がん作用、循環器系疾患の予防に効果があると言われている¹⁸⁾。これら有用な成分が、苗木だけでなく樹高10mほどに成長した*Es*の葉にも一定量含まれていることが明らかになり、これら有用成分に着目した葉の利用が期待できる。

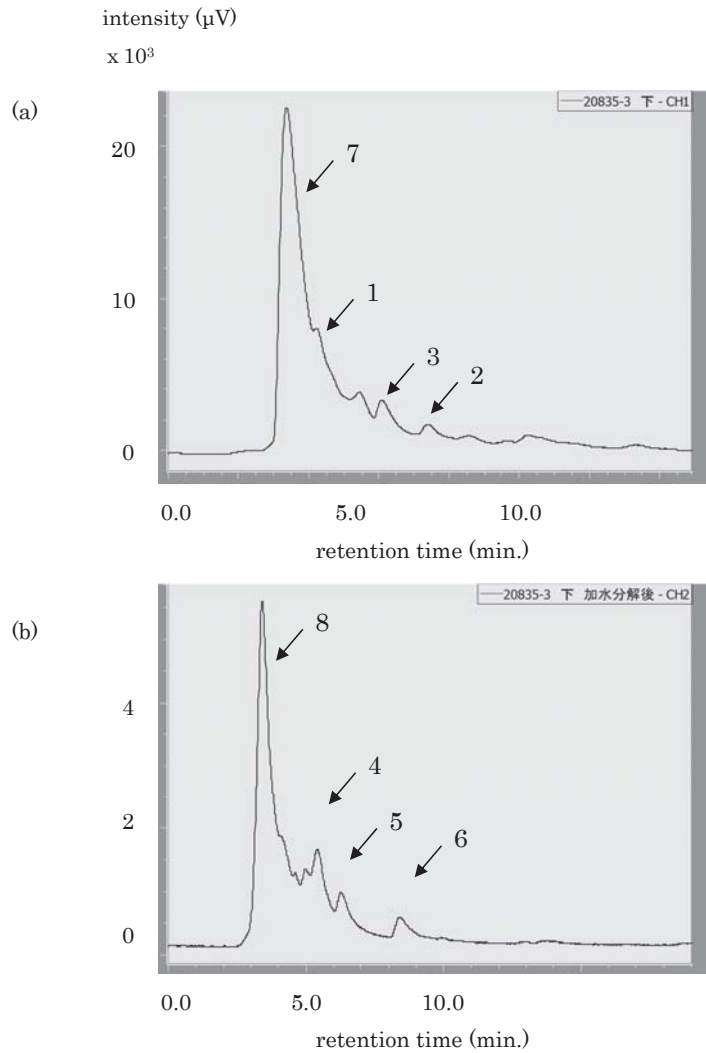


図 6. *Es* 葉の試料より検出した化合物類のクロマトグラム (系統番号 20835)
 Fig. 6. Chromatogram of compounds detected from *Es* leaf samples (20835 strain)

(a) 加水分解前 (条件②: メタノール 38% コンスタント)

(b) 加水分解後 (条件③: メタノール 70% コンスタント)

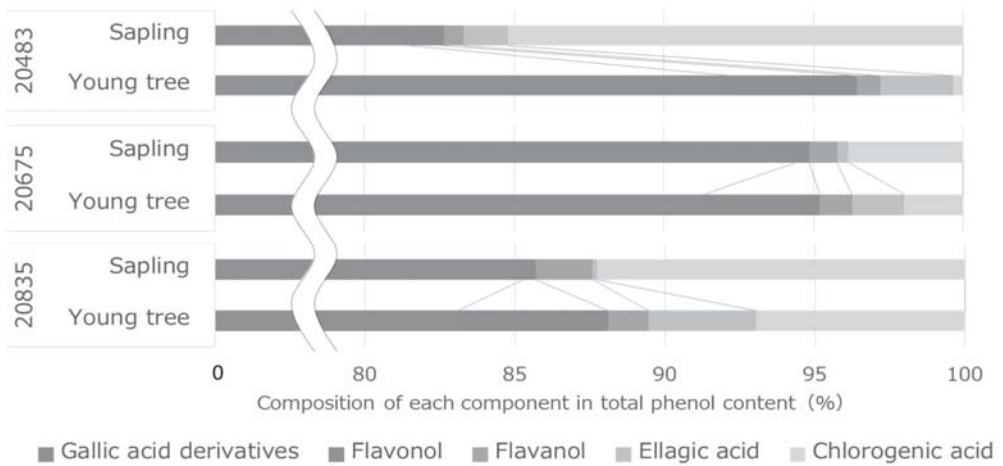
ピーク番号

1: 没食子酸, 2: 没食子酸メチル, 3: クロロゲン酸, 4: エラゲ酸, 5: ケルセチン,
 6: ケンフェロール, 7 および 8: 没食子酸または没食子酸メチルの配糖体

表 7. *Es* 葉に含まれる乾重量当たりのフェノール性成分 (%) (20675 系統)Table 7. Phenolic component (%) per dry weight contained in *Es* leaves (20675 strain)

	20675			
	Sapling (upper)	2-3 years (upper)	Sapling (lower)	2-3 years (lower)
Phenolics	18.8	10.2	14.5	11.1
Flavanol	0.606	0.145	0.051	0.249

※苗木の値は参考値 (出典: 稲垣¹²⁾)

図 7. 成長段階における *Es* 系統間の成分組成比較Fig. 7. Component composition comparison between *Es* lines at the growth stage

3.1.3 系統間の比較

比色定量により得た, *Es* の系統番号 20835, 20675, 20483 の若木の葉を樹高別に採取したものから, 乾重量当たりのフェノール量およびフラバノール量と, 各サンプルの採取時の地面からの高さ (cm) との関係を示した。また, フェノール量, フラバノール量と葉の地面からの高さとの関連性を調べるために, 相関係数 (CORREL 関数) を Excel に

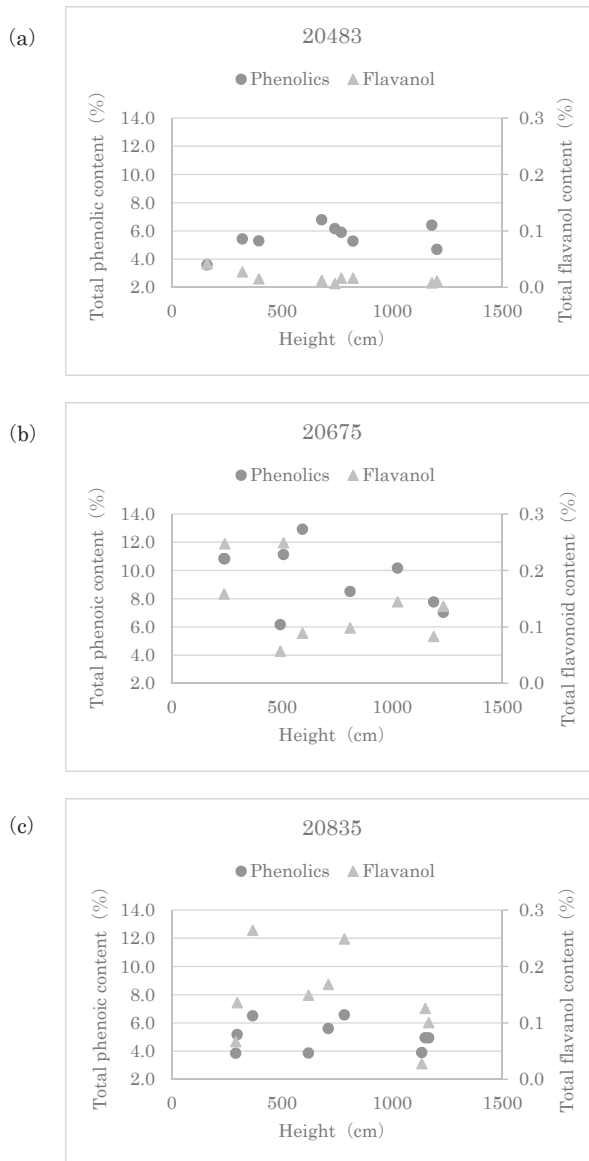


図 8. 葉に含まれるフェノール性成分と樹高との関係

Fig. 8. Relationship between tree height and phenolic components contained in leaves

(a) *Es*20483 系統, (b) *Es*20675 系統, (c) *Es*20835 系統

より算出した (Table 8)。苗木では 20483 系統のフェノール量は、とくに、地面からの高さで強い負の相関関係を示していた³⁾が、2-3 年生の若木では高さでフェノール量との間にやや強い正の相関が見られた。すなわち、20483 系統の苗木では地面に近い位置の葉ほどフェノール量が多い傾向が見られたのに対し、樹高約 10 m の 2-3 年生若木では、地面に近い位置の葉ほどフェノール量が少なくなり、その成分の生産および蓄積の傾向に逆転が見られた。一方で 20483 系統のフラバノールについては、苗木においても 2-3 年生若木においても、高さで強い負の相関が見られ、地面に近い位置の葉ほどフラバノール量が多い傾向が維持されていた。また、20835 系統と 20675 系統には苗木と同様、地面からの高さで葉のフェノール性成分量についてとくに強い相関は見られなかった。3 系統間で成分量の比較を行ったところ、20483 系統はほかの 2 系統に比べてとくにフラバノール量が少なく、これは苗木や培養細胞 (3.1.1) と同じ傾向であった。20675 系統は 3 系統のうちで最も多くのフェノール性成分を生産していた。*E. saligna* という種の中でも、系統番号によってフェノール性成分が蓄積、または生産されるしくみに違いが見られることが示唆された。

表 8. *Es* 系統番号別のフェノール、フラバノール含有量と高さとの相関係数

Table 8. Correlation coefficient between phenol, flavanol content and height according to *Es* strain

	20483	20675	20835
Phenolics	0.41	-0.48	-0.13
Flavanol	-0.70	-0.18	-0.39

3.2 *Es* 由来 PAL 様遺伝子配列 (*EsPAL*) のクローニング

3.2.1 mRNA 抽出に用いたサンプルの特徴

mRNA 抽出に用いた 3 系統の苗木と同じ個体から採取した葉の成分について、比色定量を行った。20835 系統ではフラバノール量が非常に少なく、検出できなかったが、各系統から総量として乾重量当たり 10%前後のフェノール性成分の存在が確認された (Table 9)。

表 9. mRNA 抽出に用いた葉の乾重量当たりのフェノール性成分含有量平均 (%)

Table 9. Phenolic component content per dry weight of leaves used for mRNA extraction (%)

	20483	20675	20835
Phenolics	10.5	8.6	8.4
Flavanol	0.03	0.01	0.00

3.2.2 粗酵素液中の PAL 活性

HPLC の結果、粗酵素液サンプルから桂皮酸の生成が確認できた (Fig. 9)。*EsPAL4* に関しては、それぞれ 15 サンプルのうちから 20483 系統で 2 つ、20675 および 20835 系統では 1 つ、他に比べて著しく活性の高いものが確認された。*EsPAL5* に関しては、20675 系統で 26 サンプル中 6 つ、高い活性を示した酵素を確認した。活性のあった PAL については次の 3.2.3 で、クローニングした配列情報とまとめて Table 10 に示す。

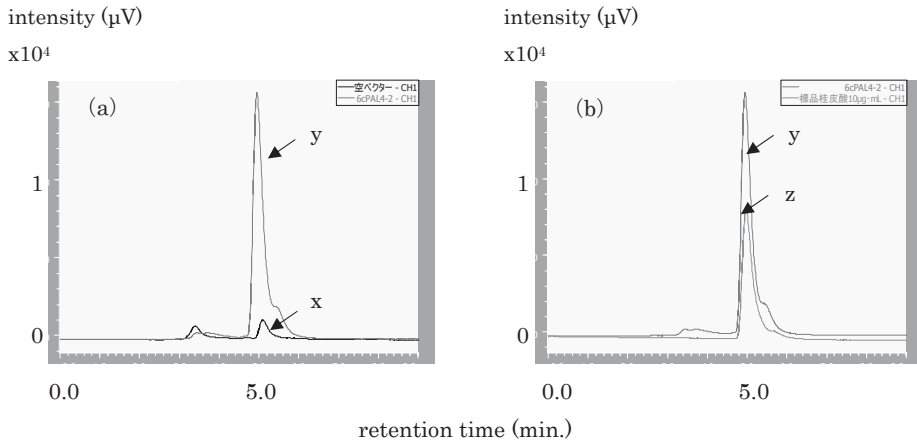


図9. HPLC 分析による PAL 活性の検出

Fig. 9. Detection of PAL activity by HPLC analysis

x : Control, y : 反応後の粗酵素液 (*Es6cPAL4-2*), z : 桂皮酸の標品 (10 $\mu\text{g/mL}$)

(a) 組換えタンパク質を発現させた粗酵素液の PAL 活性

(b) 桂皮酸の標品 (10 $\mu\text{g/mL}$) との保持時間の一致

表 10. クローニングした PAL 様遺伝子配列の数一覧

Table 10. Number of cloned PAL-like gene sequences

	<i>Es20483</i>		<i>Es20675</i>		<i>Es20835</i>		<i>E. grandis</i> ⁽¹⁰⁾	<i>E. robusta</i> ⁽⁹⁾
	genomic DNA	cDNA	genomic DNA	cDNA	genomic DNA	cDNA		
<i>EsPAL1</i>	*1	1	*1	1	*1	0	1	1
<i>EsPAL2</i>	*1	0	*1	*1	*1	0	5	>5
<i>EsPAL3</i>	1	0	1	0	1	0	1	*2
<i>EsPAL4</i>	2	4	3	1	4	1	1	*2
<i>EsPAL5</i>	5	0	1	6	1	0	1	*2

*1 今回全配列の取得はできなかったが、複数の部分配列の存在を確認しているもの

*2 該当の遺伝子配列に関する情報がなく、配列の有無は不明

Myburg, A. A. *et al.*⁽¹⁰⁾, 植木⁽⁹⁾ から得た情報を編集

3.2.3 クローニングした *EsPAL* について

今回, *Es* の 3 系統から計 32 の PAL 様遺伝子配列を得た。その詳細を以下に示す。なお, 配列名の表記上 *Es* と PAL の間の数字とアルファベット (ex. *Es4cPAL3* の “4c” 部分) は *Es* の系統番号とクローニングしたサンプルの由来を示し, 4 : 20483 系統, 6 : 20675 系統, 8 : 20835 系統, c : cDNA 由来, d : ゲノム DNA 由来, を意味する。

EgrPAL9 の遺伝子配列から設計したプライマーからクローニングした *EsPAL1* について, 20483 系統の cDNA から 1 つ (*Es4cPAL1*), 20675 系統の cDNA から 1 つ (*Es6cPAL1*) の配列を得た。いずれも ORF (Open Reading Frame) は, *EgrPAL9* と同じく, 715 残基のアミノ

酸配列をコードする 2145 bp の塩基配列から成り立っていた。アミノ酸配列の相同性は *Es4cPAL1*, *Es6cPAL1*, *ErPAL1*, *EgrPAL9* のそれぞれの間で 99% であった。ゲノム DNA 上には 3 系統共に部分配列の存在が確認できたが、全長を取得することはできなかった。

EgrPAL1 の遺伝子配列から設計したプライマーからクローニングした *EsPAL3* について、20483 系統のゲノム DNA から 1 つ (*Es4dPAL3*), 20675 系統のゲノム DNA から 1 つ (*Es6dPAL3*), 20835 系統のゲノム DNA から 1 つ (*Es8dPAL3*) の配列を得た。いずれも ORF は、*EgrPAL1* と同じく 708 残基のアミノ酸配列をコードする 2124 bp の塩基配列から成り立っており、エキソンが 2 つ、イントロンが 1 つの構造であった。アミノ酸配列の相同性は *Es4dPAL3*, *Es6dPAL3*, *Es8dPAL3*, *EgrPAL1* の間で 100% であった。しかし塩基配列はそれぞれ数塩基ずつ異なり、100% 一致するものはなかった。

EgrPAL8 の遺伝子配列から設計したプライマーからクローニングした *EsPAL4* について、20483 系統のゲノム DNA から 2 つ (*Es4dPAL4-1*, *Es4dPAL4-2*), cDNA から 4 つ (*Es4cPAL4-13*, *Es4cPAL4-15*, *Es4cPAL4-19*, *Es4cPAL4-20*), 20675 系統のゲノム DNA から 3 つ (*Es6dPAL4-3*, *Es6dPAL4-4*, *Es6dPAL4-10*), cDNA から 1 つ (*Es6cPAL4-2*), 20835 系統のゲノム DNA から 4 つ (*Es8dPAL4-10*, *Es8dPAL4-11*, *Es8dPAL4-37*, *Es8dPAL4-45*), cDNA から 1 つ (*Es8cPAL4-16*) の配列を得た。*EgrPAL8* と同じく、エキソンが 2 つ、イントロンが 1 つの構造であった。*EgrPAL8* が 723 残基のアミノ酸配列をコードする 2169 bp の塩基配列から成る ORF を有していたのに対し、*EsPAL4* には 3 種類の長さの ORF の存在が確認できた。1 つは、*EgrPAL8* と同じく 723 残基のアミノ酸配列をコードする 2169 bp のもので、イントロン部分は 1763, 1770, 1772, 1773 bp のものが存在した。この長さの ORF をもつ配列は、*Es* の 3 系統すべてで確認された。2 つ目は、722 残基のアミノ酸配列をコードする 2166 bp の塩基配列から成り立ち、イントロン部分は 1762, 1771 bp であるもので、これは *Es* の 20483 系統と 20835 系統で確認された。3 つ目は、721 残基のアミノ酸配列をコードする 2163 bp の塩基配列から成り立ち、イントロン部分が 1775 bp であるもので、これは *Es* 20675 系統でのみ確認できた (*Es6dPAL4-10*)。ゲノム DNA 上のイントロンの長さは 1762-1775 bp と塩基数に幅があったが、イントロン部分の相同性はそれぞれ 86-99% であり、ORF の長さによる特徴はなかった。*Es6cPAL4-2*, *Es8cPAL4-16*, *Es6dPAL4-4*, *Es8cPAL4-1*, *Es8dPAL4-10* についてはアミノ酸配列の相同性は 100% 一致した。*Es6cPAL4-2* と *Es6dPAL4-4* の組み合わせのみ塩基配列も 100% 一致したため、これらは 20675 系統のもつ同じ 1 つの PAL であると考えられる。ほかの PAL どうしでは塩基配列は数塩基ずつ違いが見られ、100% 一致するものはなかった。また、そのほかの PAL のアミノ酸配列の相同性はそれぞれ 97-99% であった。

EgrPAL2 の遺伝子配列から設計したプライマーからクローニングした *EsPAL5* について、20483 系統のゲノム DNA から 5 つ (*Es4dPAL5-14*, *Es4dPAL4-15*, *Es4dPAL4-64*, *Es4dPAL4-65*, *Es4dPAL4-67*), 20675 系統のゲノム DNA から 1 つ (*Es6dPAL5*), cDNA から 6 つ (*Es6cPAL5-2*, *Es6cPAL5-8*, *Es6cPAL5-14*, *Es6cPAL5-17*, *Es6cPAL5-22*, *Es6cPAL5-26*), 20835 系統のゲノム DNA から 1 つ (*Es8dPAL5*) の配列を得た。いずれも *EgrPAL2* と同じくイントロンを持たない構造であり、ORF は、703 残基のアミノ酸配列をコードする 2106 bp の塩基配列から成り立っていた。アミノ酸配列の相同性に関しては、*Es6cPAL5-14*, *Es6cPAL5-17*, *Es6cPAL5-22* が 100% 一致した。また、*Es6dPAL5* と *Es8dPAL5* も 100% であった。しかし、これらについては塩基配列が数塩基ずつ異なり、100% 一致するものはなかった。そのほかの PAL のアミノ

酸配列の相同性はそれぞれ 98-99%であった。

Table 10 に示した通り、3 系統すべてから多数の PAL 様遺伝子配列をクローニングすることができ、*E. grandis* がゲノム上に全部で 9 つの PAL をもつとされているのに対し、*Es* は少なくともその 3 倍以上の数の PAL をもつことがわかった。クローニングしたそれぞれの PAL の Accession No. は Table 11 に示した。

表 11. クローニングした *Es*PAL の Accession No.

Table 11. Cloned *Es*PAL Accession No.

20483		20675		20835	
配列名	Accession No.	配列名	Accession No.	配列名	Accession No.
<i>Es4cPAL1</i>	KY204055	<i>Es6cPAL1</i>	KY204056	<u><i>Es8cPAL4-16</i></u>	KY2040560
<u><i>Es4cPAL4-13</i></u>	KY204057	<u><i>Es6cPAL4-2</i></u>	KY204059	<i>Es8dPAL3</i>	KY204038
<u><i>Es4cPAL4-15</i></u>	KY204058	<u><i>Es6cPAL5-2</i></u>	KY126097	<i>Es8dPAL4-10</i>	KY204044
<u><i>Es4cPAL4-19</i></u>	KY204061	<u><i>Es6cPAL5-8</i></u>	KY126098	<i>Es8dPAL4-11</i>	KY204045
<u><i>Es4cPAL4-20</i></u>	KY204062	<u><i>Es6cPAL5-14</i></u>	KY126099	<i>Es8dPAL4-37</i>	KY204046
<i>Es4dPAL3</i>	KY204036	<u><i>Es6cPAL5-17</i></u>	KY126100	<i>Es8dPAL4-45</i>	KY204047
<i>Es4dPAL4-1</i>	KY204039	<u><i>Es6cPAL5-22</i></u>	KY126101	<i>Es8dPAL5</i>	KY204054
<i>Es4dPAL4-2</i>	KY204040	<u><i>Es6cPAL5-26</i></u>	KY204067		
<i>Es4dPAL5-14</i>	KY204048	<i>Es6dPAL3</i>	KY204037		
<i>Es4dPAL5-15</i>	KY204050	<i>Es6dPAL4-3</i>	KY204041		
<i>Es4dPAL5-64</i>	KY204051	<i>Es6dPAL4-4</i>	KY204042		
<i>Es4dPAL5-65</i>	KY204049	<i>Es6dPAL4-10</i>	KY204043		
<i>Es4dPAL4-67</i>	KY204052	<i>Es6dPAL5</i>	KY204053		

※太字に下線は粗酵素で活性を確認したもの

※太字は粗酵素で活性が見られなかったもの

3.2.4 予想されるアミノ酸配列の解析およびフェノール性成分との関連の考察

今回得られた PAL 様遺伝子配列から予想されるアミノ酸配列と、既知の PAL を含めたアミノ酸配列を Clustal W を用いて比較した。フェニルアラニンを脱アミノ化して桂皮酸を作る PAL の反応が起こる際、求核基として働く MIO (3,5-dihydro-5-methylidene-4H-imidazol-4-one) ドメインがあり、この存在が PAL の反応機構に必須であると言われている¹⁹⁾。得られたすべてのアミノ酸配列において、MIO ドメインを形成する Ala-Ser-Gly の 3 アミノ酸残基、およびその付近でよく保存されている領域が存在した。また、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。これまでに、ヌルデ (*Rhus chinensis*) の PAL では、いくつかのアミノ酸が変異した場合に PAL 活性が大きく変化するという報告がある²⁰⁾。これによると、保存性の高いアミノ酸残基のうち、Phe¹²⁶ を His に置換すると PAL 活性が 75% 低下し、TAL (チロシンアンモニリアーゼ) 活性が 22 倍に上昇する。また、MIO ドメインを形成する A-S-G の Ser¹⁹⁴ を Trp に置換すると 95% 活性が低下し、活性中心付近の Asp³⁷⁴ を Ala に置換すると 80% 活性

が低下する。キュウリの PAL では、Tyr³⁴⁸ がプロトンの放出に関わる重要な役割を果たし、Gly⁴⁹¹ は活性部位の中心に位置するため、これに変異が起こると PAL 活性が検出されなくなるということもわかっている⁶⁾。さらに、ハーブの一種である *Picrorhiza kurroa* のもつ PAL の構造解析の結果、Asn²⁵⁸, Asn³⁸², Phe³⁹⁸, Phe¹⁰⁶, Leu²⁵⁴, Asn⁴⁸⁴ が基質の結合において必要であるということが報告されている²¹⁾。したがって、これらのアミノ酸残基は PAL 活性を示すうえで重要であると考えられる。今回クローニングした *EsPAL* では、*Es4cPAL4-15* の 498 番目のアミノ酸残基のみ、Asn → Asp に変わっていた。この酵素については粗酵素液レベルで活性を確認したものであるため、*EsPAL4* が PAL 活性を示すうえで、この Asn の変異はほとんど影響を与えないと思われる。それ以外の保存性の高いアミノ酸残基はすべて保存されていたため、今回クローニングした *EsPAL* はすべて、PAL 活性を示す要件を備えていると考えられた (Fig. S1)。

また、それぞれの PAL のアミノ酸配列の、N 末端側の相同性は中心部部分に比べて低く、多様性があった。既知の植物の PAL では、最初の 30 ほどのアミノ酸残基の保存性は低く、相同性も低いことがわかっているため、この N 末端側のアミノ酸配列の多様性は、PAL 活性に大きな影響を与えないと考えられる。

3.2.1 で示した結果より、mRNA に用いた 20835 系統の葉からはフラバノールが検出できず、その cDNA からは *EsPAL4* の 1 つしかクローニングできなかった (Table 10)。フラバノールの生合成には PAL のはたらきが必須であることから、20835 系統では、ほかの 2 系統に見られた *EsPAL1* や *EsPAL5* の発現が確認できなかったことが、フラバノール量が検出できなかったことと関連している可能性がある。すなわち、*Es* におけるフラバノールの生合成には *EsPAL1*, *EsPAL5* のうち 1 つ、もしくは両方のはたらきが重要である可能性が示された。また、同じ条件で育てた苗木の葉から mRNA を抽出したにもかかわらず、今回フェノール性成分の量や、発現が確認できた PAL の種類および数は、系統によって異なっていた。これは、同じ *E. saligna* という種の中でも系統ごとの PAL のはたらきが異なっており、その特徴が表れた可能性がある。

3.2.5 *EsPAL4* および *EsPAL5* に着目した系統間比較

今回、*EsPAL4* および *EsPAL5* は各系統で非常に相同性の高い配列が多数クローニングされたが、その中で塩基配列まで完全に一致するものはわずか 1 組しか存在しなかった。これに関して、クローニングの過程で、ポリメラーゼ酵素による複製エラーや大腸菌による形質転換時のエラーによって PAL の全長の中で 1-2 塩基のエラーが入る可能性は否定できない。しかし、どの配列の組み合わせでも、エラーが入る確率以上に異なる塩基の組み合わせが観察されることから、今回クローニングした非常に相同性の高いが数塩基ずつ異なる PAL 様遺伝子群はすべて、独立した異なる PAL であると推察される。また、同じ *EsPAL4* 内および *EsPAL5* 内でのアミノ酸配列の相同性は 97% 以上を示し、保存性の高いアミノ酸残基も同じように有していることから、タンパク質の構造はほぼ同じであることが考えられる。

EsPAL4 および *EsPAL5* の遺伝子配列から予測したアミノ酸配列について、それぞれで系統樹を作成した (Fig. 10, 11)。

EsPAL4 の系統樹 (Fig. 10) では、20483 系統でひとつのクレードを形成した。このクレード内では Glu⁶⁹⁴ → Lys としてすべて保存されていた。*EsPAL5* の系統樹 (Fig. 11) においても、*EsPAL4* と同様に 20483 系統のみでひとつのクレードを形成した。このクレード内では、Gln¹⁸¹ → Arg としてすべて保存されていた。これらの結果から、*Es20483* 系統のみ、*E. grandis*

やほかの2系統の*Es*と異なる進化的特徴をもつ可能性が示された。20483系統は、3.1.3で述べたように、ほかの2系統とフェノール性成分の生産や蓄積に関して異なる仕組みを持っていることが示唆されており、この成分の生産や蓄積に関する系統ごとの違いと、今回の*Es*PAL4および*Es*PAL5の系統学的な特徴とが、何らかの形で関連していると考えられる。*Es*PAL4および*Es*PAL5がフェノール性成分の生合成にどのように関わっているかについてはわかっていないため、今後これらのPALのキャラクタライズを行い、具体的な成分の生合成との関連について明らかにしたうえで、さらなる議論が必要である。

さらにほかの系統について、*Es*PAL4の系統樹 (Fig. 10) で20675系統および20835系統が、*Egr*PAL8と系統学的に近い位置に存在していた。*Es*PAL5の系統樹 (Fig. 11) を見ると、cDNAからクローニングし粗酵素液レベルで活性を確認した20675系統のPAL (*Es*6cPAL5群)で、ひとつのクレードを形成した。一方で、同じ20675系統からクローニングしたものの中でも、ゲノムDNAからクローニングした*Es*6dPAL5のみがこのクレードに属さず、20835系統の*Es*8dPAL5および*Egr*PAL2と系統学的に近い位置に存在していた。これらの結果から、*Es*の20675および20835系統は*E. grandis*と遺伝子的に非常に近いことが考察できる。また、*Es*6cPAL5で形成したクレードに関して、これらのアミノ酸配列の特徴について調べた。*Es*6cPAL5のクレードでは、ほかのPAL5と比較して、アミノ酸残基がThr¹⁷→Ala, Asp⁶⁸⁶→Asnとしてすべて保存されていた。したがって、これらのアミノ酸が、*Es*PAL5が発現または活性を示すうえで、重要な役割を担っている可能性がある。

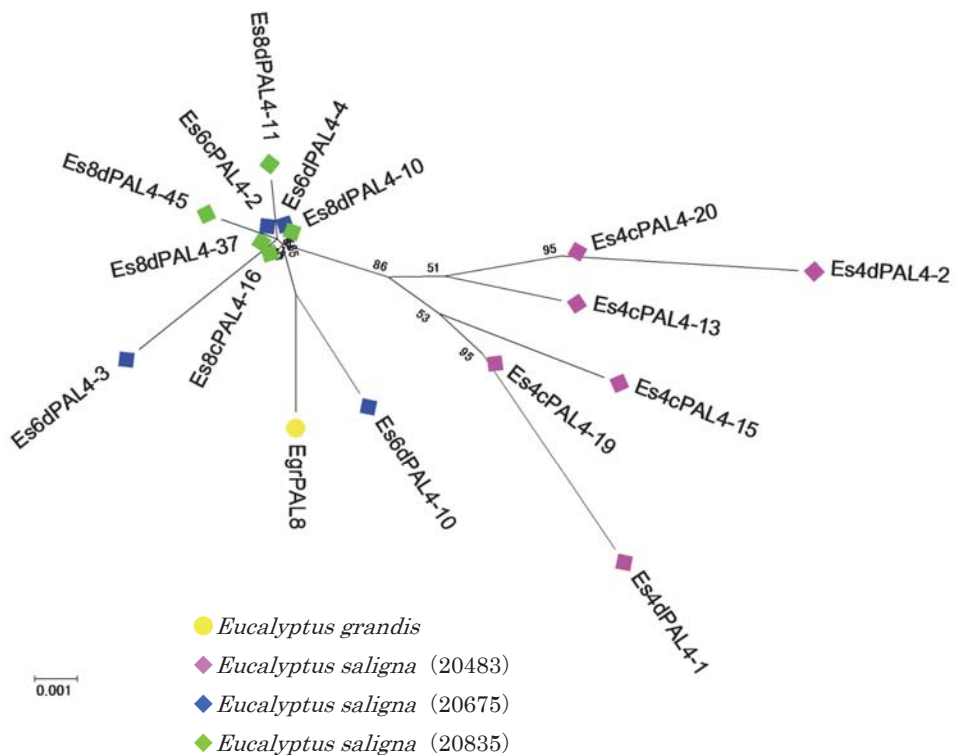


図 10. *Es*PAL4 系統樹 (近隣結合法)
 Fig. 10. *Es*PAL4 phylogenetic tree (neighbor joining method)

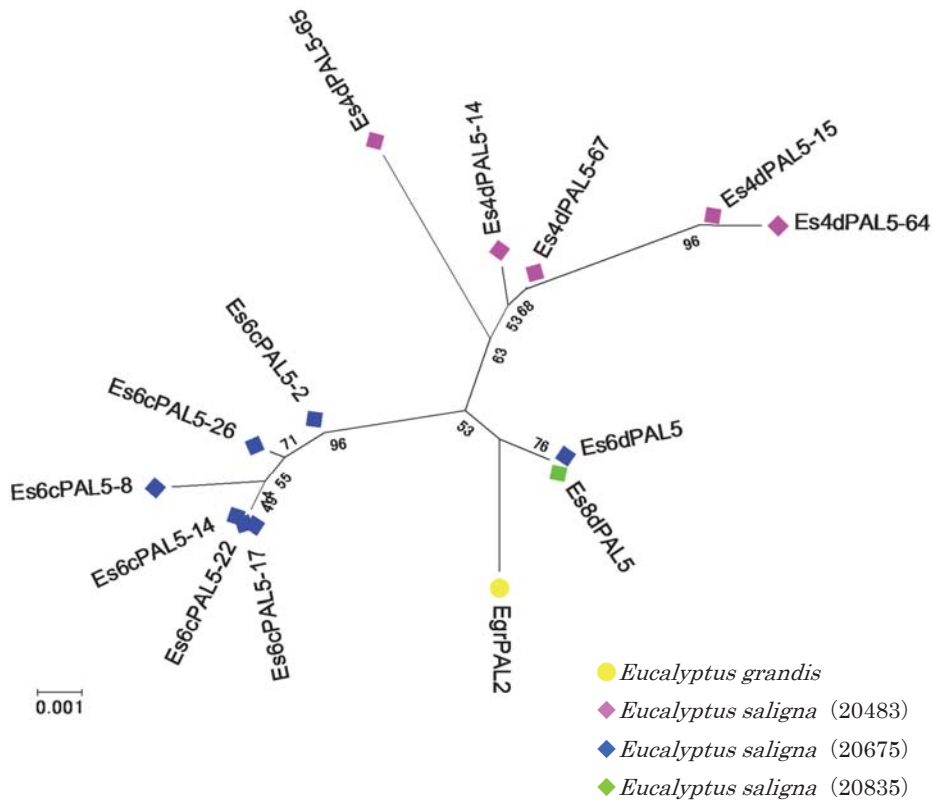


図 11. *Es*PAL5 系統樹 (近隣結合法)

Fig. 11. *Es*PAL5 phylogenetic tree (neighbor joining method)

3.2.6 系統解析

今回 *Es* からクローニングした PAL 様遺伝子配列はすべて、既知の PAL の活性部位と保存性の高いアミノ酸残基を有していた。これらについて、既知の植物のもつ PAL との比較を行い、系統樹を作成した (Fig. 12)。その結果、アントシアニンの生合成に関わるとされる *A. thaliana* のもつ, *At*PAL1 および *At*PAL2 と, *Es*4dPAL3, *Es*6dPAL3, *Es*8dPAL3, *Egr*PAL1 のクレードが系統学的に近い位置に見られた。*Es* の各系統のゲノム上に 1 つずつ存在したこの *Es*PAL3 は、*Es* のフェノール性成分の生合成に関わる PAL の遺伝子配列である可能性が示唆された。また、*Egr*PAL2 を含む *Es*PAL5 は独立したひとつのクレードを形成し、ほかの植物のもつ PAL から離れた遠い場所に位置した。同じ *Es* 由来である *Es*PAL1-4 とうしの相同性が 80% 以上であるのに対し、*Es*PAL5 のみほかの *Es*PAL との相同性も低く、57-60% であった。これら *Es*PAL5 は、裸子植物のもつ PAL とより近い場所に位置し、イントロンを持たない構造であった。

機能未知の *Es*PAL4 および *Es*PAL5 に関しては、3 系統それぞれで非常に相同性の高い配列が複数クローニングできた。これまでの研究により、キュウリなどの PAL に関しては、同染色体上のブロックで遺伝子配列の縦列重複 (Tandem gene duplication) が起きていることがわかっており、その中でも活性をもつ PAL と活性をもたない偽遺伝子の PAL とがあることが報告されている⁶⁾。*E. grandis* についても、同じ染色体上の非常に近い位置に存在する *Egr*PAL4,

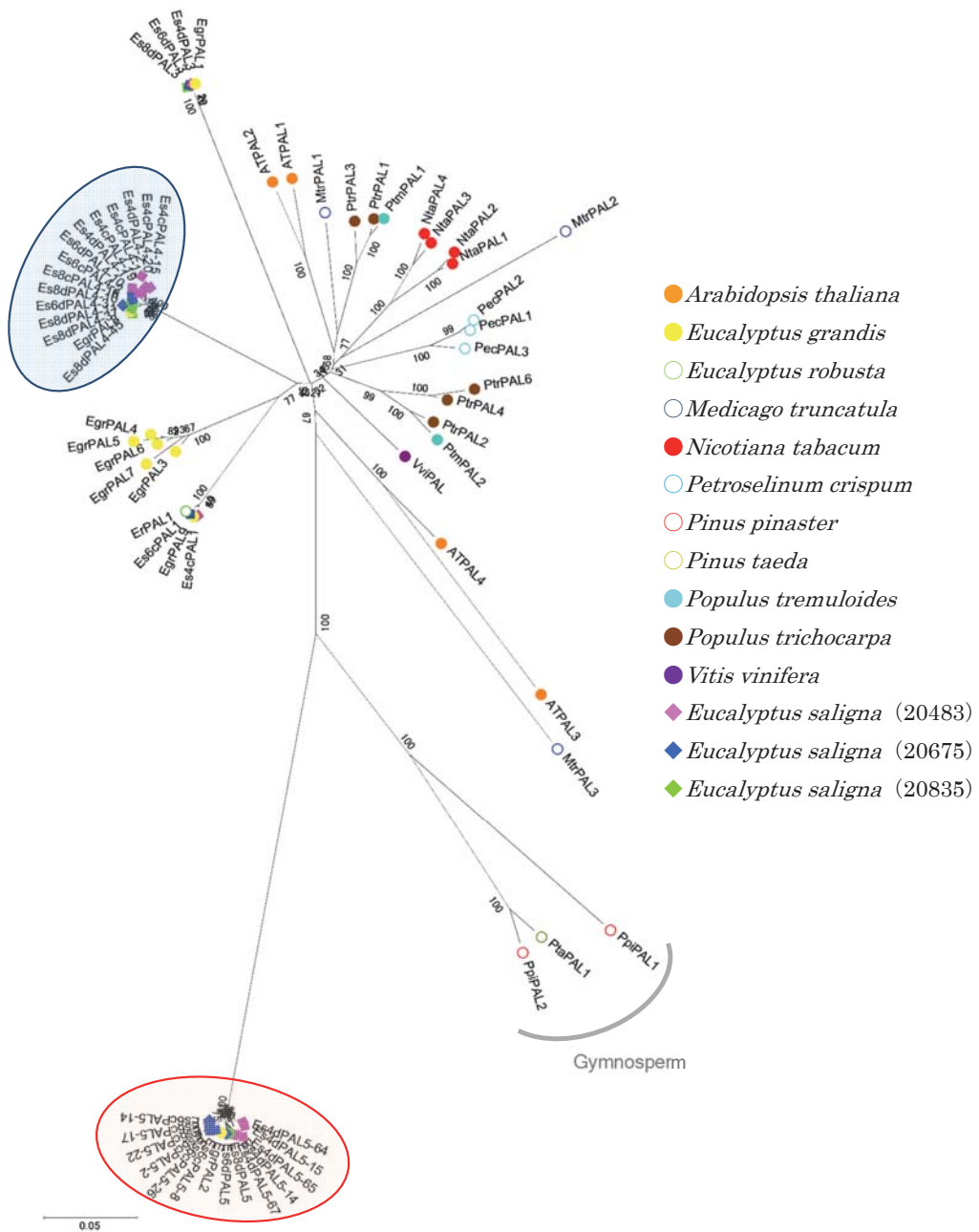


図 12. 既知の植物の PAL と EsPAL の系統樹 (近隣結合法)

Fig. 12. Phylogenetic trees of EsPAL and PAL of known plants (neighbor joining method)

○ : EsPAL4 および EgrPAL8 を含むクレード, ○ : EsPAL5 および EgrPAL2 を含むクレード

EgrPAL5, *EgrPAL6*, *EgrPAL7* に関しては、この縦列重複が起きていると推察されており²²⁾、その中に偽遺伝子が含まれるかどうかについてはよくわかっていない。これらの縦列重複の現象は、主に進化の過程でゲノムの倍数化を経験することによって獲得されると考えられ、イネなどいくつかの植物でも観察されている²³⁾。その中でも *E. grandis* は、タンパク質をコードすると予想される遺伝子 36,376 個のうちの 34% は縦列重複となっており、この比率はこれまで塩基配列が解読された植物ゲノムの中で最大であると言われている¹⁰⁾。したがって、*E. grandis* と遺伝子的に非常に近い関係にあると予想される *Es* も、同様にゲノム上の多くの部分で縦列重複遺伝子を持ち、非常に相同性の高い PAL 様遺伝子配列を複数保持している可能性がある。また、*Es* の生産するフェノール性成分の量の多さや多様性が、この大量に存在する PAL 様遺伝子配列と関連していることも推察される。*EsPAL4* および *EsPAL5* のフェノール性成分との関連について、および縦列重複によって獲得されたものかどうかについては、今後ゲノム情報の解読を行い *Es* の遺伝子配列の全容を明らかにしたうえで、さらなる議論が必要である。

4. 結論

本研究では、*Es* の産地の異なる 3 系統について、2-3 年生の若木の葉に含まれるフェノール性成分を分析した。*Es* は苗木の葉において、同じ種の中でも系統によってフェノール性成分の量や組成が異なることがわかっていたが、今回用いた 2-3 年生の若木でも同じ傾向が見られることを明らかにした。*Es* の 3 系統の中で 20483 系統のみ、葉に含まれるフェノール性成分の量や組成と、葉の採取時の地面からの高さとの、有意な相関関係が見られることがわかった。2-3 年生の *Es* 若木の葉から抽出したフェノール性成分は、苗木と比べて乾重量あたり 5-10% 減少していた。しかし、依然乾重量あたり 10% 前後のフェノール性成分が含まれており、一般的に樹木の二次代謝成分の全体に占める割合が数%程度である、と言われていることとあわせて考えると、*Es* はフェノール性成分を多く生産する種であると言え、その利用が期待される。今回フラバノールやフラボノール、クロロゲン酸などの有用な成分が、苗木だけでなく樹高 10 m ほどに成長した *Es* の葉にも一定量含まれていることを明らかにしたことから、*Es* が材として利用されるまでに成長した際の、葉の利用価値の高さが示された。

E. grandis のもつ 9 つの PAL に対応する配列は、*Es* の 3 系統のゲノム上にも存在することが確認できた。3 系統合わせて計 32 個の PAL 様遺伝子配列を得ることができ、解析の結果、*Es20675* 系統および 20835 系統は、すでにゲノム情報が開示されている *E. grandis* と遺伝子的に非常によく似た性質をもっていることがわかった。一方で *Es20483* 系統のみ、系統樹上でほかの 2 系統および *E. grandis* とは異なる場所でクレードを形成しており、同じ *Es* という種の中でも、ほかの 2 系統とは異なる進化的特徴を持つことが示唆された。20483 系統はフェノール性成分の量や組成においてもほかの 2 系統とは異なった特徴を示しており、これが PAL 様遺伝子配列の特徴の違いと関連している可能性がある。

フェノール性成分の生合成と今回クローニングされた *EsPAL* のはたらきがどのように関連しているかについては、各 PAL の精製およびキャラクタライズを行い、より詳しい解析をすることが必要である。この系統による特徴をより詳しく理解することで、同じ種の中でも利用目的に応じた系統選抜を行うことが可能になると考えられる。

引用文献

- 1) 岩崎誠・坂志朗・藤間剛・林隆久・松村順司・村田功二 (2012) 早生樹 産業植林とその利用. (海青社, 滋賀).69-77.
- 2) World Agroforestry Centre. Tree Functional Attributes and Ecological Database. (<http://www.worldagroforestry.org/output/tree-functional-and-ecological-databases>) (2017年1月参照)
- 3) 稲垣怜那・植木悠貴・寺田珠実・井上広喜・鴨田重裕・鮫島正浩 (2016) *Eucalyptus saligna* の葉に含まれるフェノール性成分の分析. 東京大学農学部演習林報告 第134号: 105-114.
- 4) Hoang, V.L.T., Innes, D.J., Shaw, P.N., Monteith, G.R., Gidley, M.J., and Dietzgen, R.G. (2015) Sequence diversity and differential expression of major phenylpropanoid-flavonoid biosynthetic genes among three mango varieties. *BMC Genomics* 16:561.
- 5) Huang, J., Gu, M., Lai, Z., Fan, B., Shi, K., Zhou, Y., Yu, J., and Chen, Z. (2010) Functional analysis of the arabidopsis PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiol.* 153(4):1526-38.
- 6) Shang, Q., Li, L., and Dong, C. (2012) Multiple tandem duplication of the phenylalanine ammonia-lyase genes in *Cucumis sativus* L. *Planta* 236(4):1093-105.
- 7) 秋元真也・石野貴久・寺田珠実・鮫島正浩・鴨田重裕 (2012) 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リアーゼの遺伝子解析. 東京大学農学部演習林演習林報告 第127号: 35-44.
- 8) 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.
- 9) 植木悠貴 (2015) *Eucalyptus robusta* におけるフェニルアラニンアンモニリアーゼ遺伝子の解析. 東京大学修士論文, 56pp.
- 10) 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., Kullam, 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., Elser, J., Boyd, A.E., Liston, A., Spatafora, J.W., Dharmawardhana, 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., Rigault, P., Tibbitts, J., Spokevicius, A., Jones, R.C., Steane, D.A., Vaillancourt, R.E., Potts, M., Joubert, F., Barry, K., Pappas Jr, G.J., 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.
- 11) Carocha, V., Soler, M., Hefer, C., Cassan-Wang, H., Fevereiro, P., Myburg, A.A, Paiva, J.A.P, and Grima-Pettenati, J. (2015) Genome-wide analysis of the lignin toolbox of *Eucalyptus grandis*. *New Phytol.* 206(4):1297-313.
- 12) 稲垣怜那 (2015) *Eucalyptus saligna* が生産するフェノール性成分に関する研究. 東京大学卒業論文, 42pp
- 13) Linsmaier, E. and Skoog, F. (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum.* 18(1):100-127.
- 14) Folin, O. and Denis, W. (1915) A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. *J. Biol. Chem.* 22(2):305-8.
- 15) Arnous, A., Makris, D., and Kefalas, P. (2002) Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from greece. *J. Food Compos. Anal.* 15(6):655-65.
- 16) Higdon, J. and Frei, B. (2003) Tea catechins and polyphenols: Health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43(1):89-143
- 17) Imai, K. and Nakachi, K. (1995) Cross-sectional study of effects of drinking green tea on

- cardiovascular and liver-diseases. *Br. Med. J.* 310(6981):693-6.
- 18) Boots, A.W., Haenen, G.R.M.M., and Bast, A. (2008) Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *Eur. J. Pharmacol.* 585(2-3):325-37.
- 19) Calabrese, J., Jordan, D., Boodhoo, A., Sariaslani, S., and Vannelli, T. (2004) Crystal structure of phenylalanine ammonia lyase: Multiple helix dipoles implicated in catalysis. *Biochemistry (NY)* 43(36):11403-16.
- 20) Ma, W., Wu, M., Wu, Y., Ren, Z., and Zhong, Y. (2013) Cloning and characterisation of a phenylalanine ammonia-lyase gene from *Rhus chinensis*. *Plant Cell Rep.* 32(8):1179-90.
- 21) Bhat, W.W., Razdan, S., Rana, S., Dhar, N., Wani, T.A., Qazi, P., Vishwakarma, R., and Lattoo, S.K. (2014) A phenylalanine ammonia-lyase ortholog (PkpAL1) from *Picrorhiza kurrooa* royle ex. benth: Molecular cloning, promoter analysis and response to biotic and abiotic elicitors. *Gene* 547(2):245-56.
- 22) Li, Q., Yu, H., Cao, P.B., Fawal, N., Mathe, C., Azar, S., Cassan-Wang, H., Myburg, A.A., Grima-Pettenati, J., Marque, C., Teulières, C., and Dunand, C. (2015) Explosive tandem and segmental duplications of multigenic families in *Eucalyptus grandis*. *Genome Biology and Evolution* 7(4):1068-81.
- 23) Ohtsubo, H., Umeda, M., and Ohtsubo, E. (1991) Organization of dna-sequences highly repeated in tandem in rice genomes. *Jpn. J. Genet.* 66(3):241-54.

(2017年4月27日受付)

(2017年7月19日受理)

要旨

2-3年生 *Eucalyptus saligna* の葉を材料に用い、80%メタノールによる抽出で得られたフェノール性成分に関して、比色分析ならびに HPLC を用いて定量的に解析した。*E. saligna* という種では、産地によって異なる系統番号が与えられており、そのうち 20835, 20675, 20483 の 3 系統においてフラバノール量の比較を行ったところ、20483 系統にのみ、地面に近い位置の葉ほどフラバノール量が多いという傾向が見られた。さらに、3 系統の *E. saligna* の葉から抽出したゲノム DNA および mRNA をもとに、PAL 様遺伝子配列の解析を行った。3 系統から合計 32 個の PAL 様遺伝子配列がクローニングでき、そのうちの複数の PAL については粗酵素液レベルでの活性を確認した。系統解析を行ったところ、20483 系統の PAL で 1 つのクレードを形成し、20483 系統はほかの 2 系統とは異なる進化的特徴をもつことがわかった。同種内で系統によってフェノール性成分の生産や蓄積の仕組み、および遺伝子配列に違いがみられることがわかった。

キーワード：*Eucalyptus saligna*, 葉, フェノール性成分, PAL

Summary

We investigated 80% methanol-soluble leaf extracts (predominantly phenolics) from 2-3 year-old *Eucalyptus saligna* (*Es*) leaves by colorimetric assay and HPLC. In the species *E. saligna*, a different line number was given depending on the production area. The flavanol content in *Es* 20483 leaf was clearly correlated to the leaf height from the ground, although other *Es* lines were not. Furthermore, PAL-like gene sequence was analyzed based on genomic DNA and mRNA extracted from leaves of three lines of *Es*. A total of 32 PAL-like gene sequences could be cloned from 3 *Es* lines, and among them, activity at the crude enzyme solution level was confirmed. Phylogenetic analysis showed that one clade was formed with 20483 PALs and 20483 strains had different evolutionary features from the other 2 lines. Within the *Es* species,

there were differences in the mechanism of production and accumulation of phenolic components, and gene sequence depending on the lineage.

Keywords: *Eucalyptus saligna*, leaves, phenolics, PAL

```

AtPAL1          -----MEINGAHKSNGGGVDAMLCGGDIKTKNMVIN--AEDPLNWGAAAEQMKGS 49
AtPAL2          -----MDQIEAMLCGGGEKTKVAVTTKTLADPLNWGLAADQMKGS 41
EgrPAL1         -----MAARHAETNGVSGFC-----LSDPLNWGLVAKSLSGSH 33
EgrPAL2         -----MAACVGNACTDEAVVDT----FVPTPVHWDKAAQSLRCH 36
EgrPAL3         -----MDMDTAACNGKGS LGLCVGAG---GDPLNWGAAAAALTGSH 38
EgrPAL4         -----MDMDTAACNGEGSLGLCAGAG---GDPLNWGAAAAALTGSH 38
EgrPAL5         -----MDMDTAACNGKGS LGLCAGAG---GDPLNWGAAAAALTGSH 38
EgrPAL6         -----MDMDTAACNGKGS LGLCAGAG---GDPLNWGAAAAALTGSH 38
EgrPAL7         -----MDMDTAACNGKGLGLCSGAG---GDPLNWGAAAAALTGSH 38
EgrPAL8         -----MEVAAAAAAAAAAAHENGNHGLPCSNNGSAPRDDPLGWGAAAE LAGSH 49
EgrPAL9         -----MEMESTTGTGNGLHSLCAAGSH--HADPLNWGAAAAALTGSH 40
ErPAL1          -----MEMESTTGTGNGLHGLCATGSR--HADPLNWGAAAAALTGSH 40
Es4cPAL4-13     -----MEVAAAAHENGNGHALPCSNNGSAPRDDPLGWGAAAE LAGSH 43
Es4cPAL4-15     -----MEVAAA AVVAAA--HENGNGHALPCSNNGSAPRGGDPLGWTAAESLAGSH 48
Es4cPAL4-19     -----MEVAAA AVVAAA--HENGNGHALPCSNNGSAPRGGDPLGWTAAESLAGSH 48
Es4cPAL4-20     -----MEVAAA AVVAAA--HENGNGHALPCSNNGSAPRDDPLGWGAAAE LAGSH 49
Es4dPAL3        -----MAARHAETNGVSGFC-----LSDPLNWGLVAKSLSGSH 33
Es4dPAL4-1      -----MEVAAA AVVAAA--HENGNGHALPCSDGSAKPRGGDPLGWTAAESLAGSH 48
Es4dPAL4-2      -----MEVAAA AVVAAA--HENGNGHALPCSNNGSAPRDDPLGWGAAAE LAGSH 49
Es4dPAL5-14     -----MAACVGNACADEAVVDTN---FVPTPVHWDKAAQSLRCH 37
Es4dPAL5-15     -----MAACVGNACADEAVVDA---FVPTPVHWDKAAQSLRCH 36
Es4dPAL5-64     -----MAACVGNACADEAVVDA---FVPTPVHWDKAAQSLRCH 36
Es4dPAL5-65     -----MAACVGNACADET VVDTN---FVPTPVHWDKAAQSLRCH 37
Es4dPAL5-67     -----MAACVGNACADEAVVDA---FVPTPVHWDKAAQSLRCH 36
Es6cPAL1        -----MEMESTTGTGNGLHSLCAAGSR--HADPLNWGAAAAALTGSH 40
Es6cPAL4-2      -----MEVAAA AVVAAA--HENGNGHALPCSNNGSAPRDDPLGWGAAAE LAGSH 49
Es6cPAL5-14     -----MAACVGNACADEAVVDA---FVPTPVHWDKAAQSLRCH 36
Es6cPAL5-17     -----MAACVGNACADEAVVDA---FVPTPVHWDKAAQSLRCH 36
Es6cPAL5-2      -----MAACVGNACADEAVVDA---FVPTPVHWDKAAQSLRCH 36
Es6cPAL5-22     -----MAACVGNACADEAVVDA---FVPTPVHWDKAAQSLRCH 36
Es6cPAL5-26     -----MAACVGNACADEAVVDA---FVPTPVHWDKAAQSLRCH 36
Es6cPAL5-8      -----MAACVGNACADEAVVDA---FVPTPVHWDKAAQSLRCH 36
Es6dPAL3        -----MAARHAETNGVSGFC-----LSDPLNWGLVAKSLSGSH 33
Es6dPAL4-10     -----MEVAAA -VVAAA--HENGNGHALPCSNNGSAPRDDPLGWGAAAE LAGSH 47
Es6dPAL4-3      -----MEVAAA AVVAAA--HENGNGHALPCSNNGSAPRDDPLGWGAAAE LAGSH 49
Es6dPAL5        -----MAACVGNACADEAVVDT----FVPTPVHWDKAAQSLRCH 36
Es8cPAL4-16     -----MEVAAA AVVAAA--HENGNGHALPCSNNGSAPRDDPLGWGAAAE LAGSH 49
Es8dPAL3        -----MAARHAETNGVSGFC-----LSDPLNWGLVAKSLSGSH 33
Es8dPAL4-10     -----MEVAAA AVVAAA--HENGNGHALPCSNNGSAPRDDPLGWGAAAE LAGSH 49
Es8dPAL4-11     -----MEVAAA AVVAAA--HENGNGHALPCSNNGSAPRDDPLGWGAAAE LAGSH 48
Es8dPAL4-37     -----MEVAAA AVVAAA--HENGNGHALPCSNNGSAPRDDPLGWGAAAE LAGSH 48
Es8dPAL4-45     -----MEVAAA AVVAAA--HENGNGHALPCSNNGSAPRDDPLGWGAAAE LAGSH 49
Es8dPAL5        -----MAACVGNACADEAVVDT----FVPTPVHWDKAAQSLRCH 36
NtaPAL1         -----MASNGHVNGGENFELCKKSADPLNWEMAAE LRGSH 36
PtrPAL1         -----METITKNG-YQNGSSESLCTQRDPLSWGVAEEAMKGS 37
* : * . * : *

```

附図 1. クローニングした *EsPAL* から予想されるアミノ酸配列アライメント

Fig. S1. Amino acid sequence alignment expected from cloned *EsPAL*

At: *A. thaliana*, *Egr*: *E. grandis*, *Er*: *E. robusta*, *Nta*: *N. tabacum*, *Ptr*: *P. trichocarpa*, *Es4*: *E. saligna* (20483), *Es6*: *E. saligna* (20675), *Es8*: *E. saligna* (20835)

AtPAL1	LDEVKRMVAEFRKP-VVNLGGETLTIGQVAAISTIGNS---VKVELSE-TARAGVNASSD	104
AtPAL2	LDEVKRMVEEYRRP-VVNLGGETLTIGQVAAISTVGG---VKVELAE-TSRAGVKASSD	96
EgrPAL1	LDEVRRMVEEFREP-VVRLSGETLTIAQVAA--VAAAG--DARVVLDE-SARAGMEASCD	87
EgrPAL2	FEEVRSLLSQFENARIVDIEGTALSVAQVTA-VARRS---EVEVQLNEGVARDRVRSRAN	92
EgrPAL3	LDEVKRMVEESRRP-VVRLGGETLTIAQVAAIAGREAG---MAVELSE-AARAGVKASSD	93
EgrPAL4	LDEVKRMVEESRRP-VVRLGGETLTIAQVAAIAGREAG---AAVELSE-AARAAVKASSD	93
EgrPAL5	LDEVKRMVEESRRP-VVRLGGETLTIAQVAAIAGREAG---AAVELSE-AARAAVKASSD	93
EgrPAL6	LDEVKRMVEESRRP-VVRLGGETLTIAQVAAIAGREAG---MAVELSE-AARAAVKASSD	93
EgrPAL7	LDEVKRMVEESRRP-VVRLGGETLTIAQVAAIAGQEAAG---AAVELLE-GARAARKASSD	93
EgrPAL8	LEEVKRMVGEYRRP-VLRLGGETLTVAQVAA-AARGAG---LTVELCE-SARPGVEASAE	103
EgrPAL9	LDEVKRMVEEYRRP-AVRLGGESLTIAQVAAVASQE-G---VGVELSE-AARPRVKASSD	94
ErPAL1	LDEVKRMVEEYRRP-AVRLGGESLTIAQVAAVASQE-G---VGVELSE-AARPRVKASSD	94
Es4cPAL4-13	LDEVKRMVGEYRRP-VLRLGGETLTVAQVAA-AARGAG---LMVELCE-SARPGVEASAE	97
Es4cPAL4-15	LEEVKRMVGEYRRP-VLRLGGETLTVAQVAA-AARGAG---LTVELCE-SARPGVEASAE	102
Es4cPAL4-19	LEEVKRMVGEYRRP-VLRLGGETLTVAQVAA-AARGAG---LTVELCE-SARPGVEASAE	102
Es4cPAL4-20	LEEVKRMVGEYRRP-VLRLGGETLTVAQVAA-AARGAG---LMVELCE-SARPGVEASAE	103
Es4dPAL3	LDEVKRMVEEFREP-VVRLSGETLTIAQVAA--VAAAG--DARVVLDE-SARAGMEASCD	87
Es4dPAL4-1	LEEVKRMVGEYRRP-VLRLGGETLTVAQVAA-AARGAG---LTVELCE-SARPGVEASAE	102
Es4dPAL4-2	LEEVKRMVGEYRRP-VLRLGGETLTVAQVAA-AARGAG---LMVELCE-SARPGVEASAE	103
Es4dPAL5-14	FEEVRSLLSQFEDARIVDIEGTALSVAQVTA-VARRS---EVEVQLNEGVARDRVRSRAN	93
Es4dPAL5-15	FEEVRSLLSQFEDARIVDIEGTALSVAQVTA-VARRS---EVEVQLNEGVARDRVRSRAN	92
Es4dPAL5-64	FEEVRSLLSQFEDARIVDIEGTALSVAQVTA-VARRS---EVEVQLNEGVARDRVRSRAN	92
Es4dPAL5-65	FEEVRSLLSQFENARIVDIEGTALSVAQVTA-VARRS---EVEVQLNEGVARDRVRSRAN	93
Es4dPAL5-67	FEEVRSLLSQFEDARIVDIEGTALSVAQVTA-VARRS---EVEVQLNEGVARDRVRSRAN	92
Es6cPAL1	LDEVKRMVEEYRRP-AVHLGGESLTIAQVAAVASQE-G---VGVELSE-AARPRVKASSD	94
Es6cPAL4-2	LEEVKRMVGEYRRP-VLRLGGETLTVAQVAA-AARGAG---LTVELCE-SARPGVEASAE	103
Es6cPAL5-14	FEEVRSLLSQFENARIVDIEGTALSVAQVTA-VARRS---EVEVQLNEGVARDRVRSRAN	92
Es6cPAL5-17	FEEVRSLLSQFENARIVDIEGTALSVAQVTA-VARRS---EVEVQLNEGVARDRVRSRAN	92
Es6cPAL5-2	FEEVRSLLSQFENARIVDIEGTALSVAQVTA-VARRS---EVEVQLNEGVARDRVRSRAN	92
Es6cPAL5-22	FEEVRSLLSQFENARIVDIEGTALSVAQVTA-VARRS---EVEVQLNEGVARDRVRSRAN	92
Es6cPAL5-26	FEEVRSLLSQFENARIVDIEGTALSVAQVTA-VARRS---EVEVQLNEGVARDRVRSRAN	92
Es6cPAL5-8	FEEVRSLLSQFENARIVDIEGTALSVAQVTA-VARRS---EVEVQLNEGVARDRVRSRAN	92
Es6dPAL3	LDEVRRMVEEFREP-VVRLSGETLTIAQVAA--VAAAG--DARVVLDE-SARAGMEASCD	87
Es6dPAL4-10	LDEVKRMVGEYRRP-VLRLGGETLTVAQVAA-AARGAG---LTVELCE-SARPGVEASAE	101
Es6dPAL4-3	LEEVKRMVGEYRRP-VLRLGGETLTVAQVAA-AARGAG---LTVELCE-SARPGVEASAE	103
Es6dPAL5	FEEVRSLLSQFENARIVDIEGTALSVAQVTA-VARRS---EVEVQLNEGVARDRVRSRAN	92
Es8cPAL4-16	LEEVKRMVGEYRRP-VLRLGGETLTVAQVAA-AARGAG---LTVELCE-SARPGVEASAE	103
Es8dPAL3	LDEVRRMVEEFREP-VVRLSGETLTIAQVAA--VAAAG--DARVVLDE-SARAGMEASCD	87
Es8dPAL4-10	LEEVKRMVGEYRRP-VLRLGGETLTVAQVAA-AARGAG---LTVELCE-SARPGVEASAE	103
Es8dPAL4-11	LEEVKRMVGEYRRP-VLRLGGETLTVAQVAA-AARGAG---LTVELCE-SARPGVEASAE	102
Es8dPAL4-37	LEEVKRMVGEYRRP-VLRLGGETLTVAQVAA-AARGAG---LTVELCE-SARPGVEASAE	102
Es8dPAL4-45	LEEVKRMVGEYRRP-VLRLGGETLTVAQVAA-AARGAG---LTVELCE-SARPGVEASAE	103
Es8dPAL5	FEEVRSLLSQFENARIVDIEGTALSVAQVTA-VARRS---EVEVQLNEGVARDRVRSRAN	92
NtaPAL1	LDEVKRMVSEFRKP-MVKLGGESLTVAQVAAIAVRDKSANGVKVELSE-EARAGVKASSD	94
PtrPAL1	LDEVKRMVAEYRKP-VVNLGAGTTLTIAQVAAIAGHDASN--VKVELSE-SARPRVKASSD	93
	::**:: : : . . : : * :*:.**:: * * * :* . . * . :	

附图 1. クローニングした *EsPAL* から予想されるアミノ酸配列アライメント (つづき)

Fig. S1. Continued

At: *A. thaliana*, Egr: *E. grandis*, Er: *E. robusta*, Nta: *N. tabacum*, Ptr: *P. trichocarpa*, Es4: *E. saligna* (20483), Es6: *E. saligna* (20675), Es8: *E. saligna* (20835)

AtPAL1	WVMESMNKGTDSYGVTTFGFATSHRRTKNGVALQKELIRFLNAGIFGSKTETSHTLPHSA	164
AtPAL2	WVMESMNKGTDSYGVTTFGFATSHRRTKNGTALQTELRFLNAGIFGNTKETCHTLPPQSA	156
EgrPAL1	WLTEGMKGMDTYGITTGFANSQWRTEGAAALQKELIRFLNAGIFGKGAETCHMLPRST	147
EgrPAL2	WVAETISCGRDIYGVTTFGFSTSNRRTTKTSDLQTELRFLNAGVIGR-----ENLPPSY	147
EgrPAL3	WVMESMCKGTDSYGVTTFGFATSHRRTKQGGALQRELRFLNAGIFGNGTESCHTLPHSA	153
EgrPAL4	WVMESMRNGTDSYGVTTFGFATSHRRTKQGGALQTELRFLNAGIFGNGTESCHMLPHSA	153
EgrPAL5	WVMESMRNGTDSYGVTTFGFATSHRRTKQGGALQTELRFLNAGIFGNGTESCHVLPHSA	153
EgrPAL6	WVMESMNGTDSYGVTTFGFATSHRRTKQGGALQTELRFLNAGIFGNGTESCHVLPHSA	153
EgrPAL7	WVMESMNGTDSYGIITTFGFATSHRRTKQGGALQMELRFLNAGIFGNGTESCHTLPHST	153
EgrPAL8	WIMESMCKGTDSYGVTTFGFATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGVFGNGTESCHTLPPQSA	163
EgrPAL9	WVMESMNKGTDSYGVTTFGFATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGIFGNGTESCHTLPPQSS	154
ErPAL1	WVMESMNKGTDSYGVTTFGFATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGIFGNGTESCHTLPPQSS	154
Es4cPAL4-13	WIMESMCKGTDSYGVTTFGFATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGVFGNGTESCHTLPPSA	157
Es4cPAL4-15	WIMESMCKGTDSYGVTTFGFATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGVFGNGTESCHTLPPSA	162
Es4cPAL4-19	WIMESMCKGTDSYGVTTFGFATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGVFGNGTESCHTLPPSA	162
Es4cPAL4-20	WIMESMCKGTDSYGVTTFGFATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGVFGNGTESCHTLPPSA	163
Es4dPAL3	WLTEGMKGMDTYGITTGFANSQWRTEGAAALQKELIRFLNAGIFGKGAETCHMLPRST	147
Es4dPAL4-1	WIMESMCKGTDSYGVTTFGFATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGVFGNGTESCHTLPPSA	162
Es4dPAL4-2	WIMESMCKGTDSYGVTTFGFATSHRRTKQGGALQKGLIRFLNAGVFGNGTESCHTLPPQTA	163
Es4dPAL5-14	WVAETISCGRDIYGVTTFGFSTSNRRTTKTSDLQTELRFLNAGVIGR-----ENLPPSY	148
Es4dPAL5-15	WVAETISCGRDIYGVTTFGFSTSNRRTTKTSDLQTELRFLNAGVIGR-----ENLPPSY	147
Es4dPAL5-64	WVAETISCGRDIYGVTTFGFSTSNRRTTKTSDLQTELRFLNAGVIGR-----ENLPPSY	147
Es4dPAL5-65	WVAETISCGRDIYGVTTFGFSTSNRRTTKTDLQTELRFLNAGVIGR-----ENLPPSY	148
Es4dPAL5-67	WVAETISCGRDIYGVTTFGFSTSNRRTTKTSDLQTELRFLNAGVIGR-----ENLPPSY	147
Es6cPAL1	WVMESMNKGTDSYGVTTFGFATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGIFGNGTESCHTLPPQSS	154
Es6cPAL4-2	WIMESMCKGTDSYGVTTFGFATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGVFGNGTESCHTLPPSA	163
Es6cPAL5-14	WVAETISCGRDIYGVTTFGFSTSNRRTTKTSDLQTELRFLNAGVIGR-----ENLPPSY	147
Es6cPAL5-17	WVAETISCGRDIYGVTTFGFSTSNRRTTKTSDLQTELRFLNAGVIGR-----ENLPPSY	147
Es6cPAL5-2	WVAETISCGRDIYGVTTFGFSTSNRRTTKTSDLQTELRFLNAGVIGR-----ENLPPSY	147
Es6cPAL5-22	WVAETISCGRDIYGVTTFGFSTSNRRTTKTSDLQTELRFLNAGVIGR-----ENLPPSY	147
Es6cPAL5-26	WVAETISCGRDIYGVTTFGFSTSNRRTTKTSDLQTELRFLNAGVIGR-----ENLPPSY	147
Es6cPAL5-8	WVAETISCGRDIYGVTTFGFSTSNRRTTKTSDLQTELRFLNAGVIGR-----ENLPPSY	147
Es6dPAL3	WLTEGMKGMDTYGITTGFANSQWRTEGAAALQKELIRFLNAGIFGKGAETCHMLPRST	147
Es6dPAL4-10	WIMESMCKGTDSYGVTTFGFATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGVFGNGTESCHTLPPSA	161
Es6dPAL4-3	WIMESMCKGTDSYGVTTFGFATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGVFGNGTESCHTLPPSA	163
Es6dPAL5	WVAETISCGRDIYGVTTFGFSTSNRRTTKTSDLQTELRFLNAGVIGR-----ENLPPSY	147
Es8cPAL4-16	WIMESMCKGTDSYGVTTFGFATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGVFGNGTESCHTLPPSA	163
Es8dPAL3	WLTEGMKGMDTYGITTGFANSQWRTEGAAALQKELIRFLNAGIFGKGAETCHMLPRST	147
Es8dPAL4-10	WIMESMCKGTDSYGVTTFGFATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGVFGNGTESCHTLPPSA	163
Es8dPAL4-11	WIMESMCKGTDSYGVTTFGFATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGVFGNGTESCHTLPPSA	162
Es8dPAL4-37	WIMESMCKGTDSYGVTTFGFATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGVFGNGTESCHTLPPSA	162
Es8dPAL4-45	WIMESMCKGTDSYVVTTFGFATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGVFGNGTESCHTLPPSA	163
Es8dPAL5	WVAETISCGRDIYGVTTFGFSTSNRRTTKTSDLQTELRFLNAGVIGR-----ENLPPSY	147
NtaPAL1	WVMDSMNKGTDSYGVTTFGFATSHRRTKNGGALQKELIRFLNAGVFGNGTETSHTLPHSA	154
PtrPAL1	WVMDSMDKGTDSYGVTTFGFATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGIFGNGTETCHTLPHSA	153

* : : * * * . : : * * * : * : * : * * * * * : : * : * :

■ F : Phenylalanine : 基質の結合に必要

囲線部は PAL 活性において重要とされるアミノ酸残基

附图 1. クローニングした *EsPAL* から予想されるアミノ酸配列アライメント (つづき)

Fig. S1. Continued

At: *A. thaliana*, Egr: *E. grandis*, Er: *E. robusta*, Nta: *N. tabacum*, Ptr: *P. trichocarpa*, Es4: *E. saligna* (20483),
Es6 : *E. saligna* (20675), Es8 : *E. saligna* (20835)

AtPAL1	TRAAMLVRINTLLQGYSGIRFEILEAITSFLNNNITPSLPLR	GTITASGDLVPLSYIASL	224
AtPAL2	TRAAMLVRVNTLLQGYSGIRFEILEAITSLLNHNISPSLPLR	GTITASGDLVPLSYIASL	216
EgrPAL1	TRAAMVVRINTLLQGYSGIRFDIPEAIAKLLNANVTPCVPLR	GSITASGDLVPLSYIASI	207
EgrPAL2	AKAAMLVRANTLMQGYSGIRWEILDAMAKLMNQNLIPKMPLR	GTITASGDLVPLSYIASL	207
EgrPAL3	TRAAMLVRINTLLQGYSGIRFEILEATMAKLLNRNITPCLPLR	GTITASGDLVPLSYIASL	213
EgrPAL4	TRAAMLVRINTLLQGYSGIRFEILEATMAKLLNRNITPCLPLR	GTVTASGDLVPLSYIASL	213
EgrPAL5	TRAAMLVRINTLLQGYSGIRFEILEATMAKLLNRNITPCLPLR	GTVTASGDLVPLSYIASL	213
EgrPAL6	TRAAMLVRINTLLQGYSGIRFEILEATMAKLLNRNITPCLPLR	GTVTASGDLVPLSYIASL	213
EgrPAL7	TRAAMLVRINTLLQGYSGIRFEILEATMAKLLNRNITPCLPLR	GTVTASGDLVPLSYIASL	213
EgrPAL8	TRAAMLVRVNTLLQGYSGIRFEILEALIKLVNSGITPCLPLR	GSISASGDLVPPFSYIASL	223
EgrPAL9	TRAAMLVRVNTLLQGYSGIRFEILEAITKFLNHNITPCLPLR	GTITASGDLVPLSYIASL	214
ErPAL1	TRAAMLVRVNTLLQGYSGIRFEILEAITKFLNHNITPCLPLR	GTITASGDLVPLSYIASL	214
Es4cPAL4-13	TRAAMLVRVNTLLQGYSGIRFEILEALIKLVNSGITPCLPLR	GSISASGDLVPPFSYIASL	217
Es4cPAL4-15	TRAAMLVRVNTLLQGYSGIRFEILEALIKLVNSGITPCLPLR	GSISASGDLVPPFSYIASL	222
Es4cPAL4-19	TRAAMLVRVNTLLQGYSGIRFEILEALIKLVNSGITPCLPLR	GSISASGDLVPPFSYIASL	222
Es4cPAL4-20	TRAAMLVRVNTLLQGYSGIRFEILEALIKLVNSGITPCLPLR	GSISASGDLVPPFSYIASL	223
Es4dPAL3	TRAAMVVRINTLLQGYSGIRFDIPEAIAKLLNANVTPCVPLR	GSITASGDLVPLSYIASI	207
Es4dPAL4-1	TRAAMLVRVNTLLQGYSGIRFEILEALIKLVNSGITPCLPLR	GSISASGDLVPPFSYIASL	222
Es4dPAL4-2	TRAAMLVRVNTLLQGYSGIRFEILEALIKLVNSGITPCLPLR	GSISASGDLVPPFSYIASL	223
Es4dPAL5-14	AKAAMLVRANTLMQGYSGIRWEILDAMAKLMNRNLI PKMPLR	GTITASGDLVPLSYIASL	208
Es4dPAL5-15	AKAAMLVRANTLMQGYSGIRWEILDAMAKLMNRNLI PKMPLR	GTITASGDLVPLSYIASL	207
Es4dPAL5-64	AKAAMLVRANTLMQGYSGIRWEILDAMAKLMNRNLI PKMPLR	GTITASGDLVPLSYIASL	207
Es4dPAL5-65	AKGAMLVRANTLMQGYSGIRWEILDAMAKLMNRNLI PKMPLR	GTITASGDLVPLSYIASL	208
Es4dPAL5-67	AKAAMLVRANTLMQGYSGIRWEILDAMAKLMNRNLI PKMPLR	GTITASGDLVPLSYIASL	207
Es6cPAL1	TRAAMLVRVNTLLQGYSGIRFEILEAITKFLNHNITPCLPLR	GTITASGDLVPLSYIASL	214
Es6cPAL4-2	TRAAMLVRVNTLLQGYSGIRFEILEALIKLVNSGITPCLPLR	GSISASGDLVPPFSYIASL	223
Es6cPAL5-14	AKAAMLVRANTLMQGYSGIRWEILDAMAKLMNQNLIPKMPLR	GTITASGDLVPLSYIASL	207
Es6cPAL5-17	AKAAMLVRANTLMQGYSGIRWEILDAMAKLMNQNLIPKMPLR	GTITASGDLVPLSYIASL	207
Es6cPAL5-2	AKAAMLVRANTLMQGYSGIRWEILDAMAKLMNQNLIPKMPLR	GTITASGDLVPLSYIASL	207
Es6cPAL5-22	AKAAMLVRANTLMQGYSGIRWEILDAMAKLMNQNLIPKMPLR	GTITASGDLVPLSYIASL	207
Es6cPAL5-26	AKAAMLVRANTLMQGYSGIRWEILDAMAKLMNQNLIPKMPLR	GTITASGDLVPLSYIASL	207
Es6cPAL5-8	AKAAMLVRANTLMQGYSGIRWEILDAMAKLMNQNLIPKMPLR	GTITASGDLVPLSYIASL	207
Es6dPAL3	TRAAMVVRINTLLQGYSGIRFDIPEAIAKLLNANVTPCVPLR	GSITASGDLVPLSYIASI	207
Es6dPAL4-10	TRAAMLVRVNTLLQGYSGIRFEILEALIKLVNSGITPCLPLR	GSISASGDLVPPFSYIASL	221
Es6dPAL4-3	TRAAMLVRVNTLLQGYSGIRFEILEALIKLVNSGITPCLPLR	GSISASGDLVPPFSYIASL	223
Es6dPAL5	AKAAMLVRANTLMQGYSGIRWEILDAMAKLMNQNLIPKMPLR	GTITASGDLVPLSYIASL	207
Es8cPAL4-16	TRAAMLVRVNTLLQGYSGIRFEILEALIKLVNSGITPCLPLR	GSISASGDLVPPFSYIASL	223
Es8dPAL3	TRAAMVVRINTLLQGYSGIRFDIPEAIAKLLNANVTPCVPLR	GSITASGDLVPLSYIASI	207
Es8dPAL4-10	TRAAMLVRVNTLLQGYSGIRFEILEALIKLVNSGITPCLPLR	GSISASGDLVPPFSYIASL	223
Es8dPAL4-11	TRAAMLVRVNTLLQGYSGIRFEILEALIKLVNSGITPCLPLR	GSISASGDLVPPFSYIASL	222
Es8dPAL4-37	TRAAMLVRVNTLLQGYSGIRFEILEALIKLVNSGITPCLPLR	GSISASGDLVPPFSYIASL	222
Es8dPAL4-45	TRAAMLVRVNTLLQGYSGIRFEILEALIKLVNSGITPCLPLR	GSISASGDLVPPFSYIASL	223
Es8dPAL5	AKAAMLVRANTLMQGYSGIRWEILDAMAKLMNQNLIPKMPLR	GTITASGDLVPLSYIASL	207
NtaPAL1	TRAAMLVRINTLLQGYSGIRFEILEAITKLINSNITPCLPLR	GTITASGDLVPLSYIASL	214
PtrPAL1	TRAAMLVRINTLLQGYSGIRFEILEAITKLLNHNITPCLPLR	GTITASGDLVPLSYIASL	213

■ASG : 活性中心, MIO ドメイン
 囲線部分は PAL 活性において重要とされる領域

附图 1. クローニングした *EsPAL* から予想されるアミノ酸配列アライメント (つづき)
 Fig. S1. Continued
 At: *A. thaliana*, Egr: *E. grandis*, Er: *E. robusta*, Nta: *N. tabacum*, Ptr: *P. trichocarpa*, Es4: *E. saligna* (20483),
 Es6 : *E. saligna* (20675), Es8 : *E. saligna* (20835)

AtPAL1	LTGRPNKATGPNGEALTAEEAFKLAGISSGFFDLQPK EGLALVNGTAVGSGMAMVLF E	284
AtPAL2	LTGRPNKATGPDGESLTAKEAFKAGISTGFFDLQPK EGLALVNGTAVGSGMAMVLF E	276
EgrPAL1	LTGRPNKAVGPDREPLNAKEAFCLAGITSGFFQLRPK EGLALVNSTAVGSGLAAMVLF E	267
EgrPAL2	LTGRHNSKVVTP EGEEISSAEALKRAGIS-GPFELQAKEGLALVNGTAVGSAVAATVCFD	266
EgrPAL3	LTGRPNKAVGPNGESLNAVEAFRLAGIEHGFFDLQPK EGLALVNGTAVGSGLASIVLVE	273
EgrPAL4	LTGRPNKAVGPNGESLNAVEAFRLAGIKHGFFDLQPK EGLALVNGTAVGSGLASIVLVE	273
EgrPAL5	LTGRPNKAVGPNGESLNAVEAFHLAGIKHGFFDLQPK EGLALVNGTAVGSGLASIVLVE	273
EgrPAL6	LTGRPNKAVGPNGESLNAVEAFRLAGIKHGFFDLQPK EGLALVNGTAVGSGLASIVLVE	273
EgrPAL7	LTGRPNKAVGPNGESLNAVEAFRLAGIEHGFFDLQPK EGLALVNGTAVGSGLASIVLVE	273
EgrPAL8	LTGRPNKAVGPAGETLTAKQAFELAGISGGFFELQPK EGLALVNGTGVGSALAAIVLFE	283
EgrPAL9	LTGRPNKAVGPDGKSLDAVEAFRLAGIDTGFFELQPK EGLALVNGTAVGSGLASIVLFE	274
ErPAL1	LTGRPNKAVGPDGKSLDAVEAFRLAGIDTGFFELQPK EGLALVNGTAVGSGLASIVLFE	274
Es4cPAL4-13	LTGRPNKAVGPAGETLTAKQAFELAGISGGFFELQPK EGLALVNGTGVGSALAAIVLFE	277
Es4cPAL4-15	LTGRPNKAVGPAGETLTAKQAFELAGISGGFFELQPK EGLALVNGTGVGSALAAIVLFE	282
Es4cPAL4-19	LTGRPNKAVGPAGETLTAKQAFELAGISGGFFELQPK EGLALVNGTGVGSALAAIVLFE	282
Es4cPAL4-20	LTGRPNKAVGPAGETLTAKQAFELAGISGGFFELQPK EGLALVNGTGVGSALAAIVLFE	283
Es4dPAL3	LTGRPNKAVGPDREPLNAKEAFCLAGITSGFFQLRPK EGLALVNSTAVGSGLAAMVLF E	267
Es4dPAL4-1	LTGRPNKAVGPAGETLTAKQAFELAGISGGFFELQPK EGLALVNGTGVGSALAAIVLFE	282
Es4dPAL4-2	LTGRPNKAVGPAGETLTAKQAFELAGISGGFFELQPK EGLALVNGTGVGSALAAIVLFE	283
Es4dPAL5-14	LTGRHNSKVVTP EGEEISSAEALKRAGIS-GPFELQAKEGLALVNGTAVGSAVAATVCFD	267
Es4dPAL5-15	LTGRHNSKVVTP EGEEISSAEALKRAGIS-GPFELQAKEGLALVNGTAVGSAVAATVCFD	266
Es4dPAL5-64	LTGRHNSKVVTP EGEEISSAEALKRAGIS-GPFELQAKEGLALVNGTAVGSAVAATVCFD	266
Es4dPAL5-65	LTGRHNSKVVTP EGEEISSAEALKRAGIS-GPFELQAKEGLALVNGTAVGSAVAATVCFD	267
Es4dPAL5-67	LTGRHNSKVVTP EGEEISSAEALKRAGIS-GPFELQAKEGLALVNGTAVGSAVAATVCFD	266
Es6cPAL1	LTGRPNKAVGPDGKSLDAVEAFRLAGIDTGFFELQPK EGLALVNGTAVGSGLASIVLFE	274
Es6cPAL4-2	LTGRPNKAVGPAGETLTAKQAFELAGISGGFFELQPK EGLALVNGTGVGSALAAIVLFE	283
Es6cPAL5-14	LTGRHNSKVVTP EGEEISSAEALKRAGIS-GPFELQAKEGLALVNGTAVGSAVAATVCFD	266
Es6cPAL5-17	LTGRHNSKVVTP EGEEISSAEALKRAGIS-GPFELQAKEGLALVNGTAVGSAVAATVCFD	266
Es6cPAL5-2	LTGRHNSKVVTP EGEEISSAEALKRAGIS-GPFELQAKEGLALVNGTAVGSAVAATVCFD	266
Es6cPAL5-22	LTGRHNSKVVTP EGEEISSAEALKRAGIS-GPFELQAKEGLALVNGTAVGSAVAATVCFD	266
Es6cPAL5-26	LTGRHNSKVVTP EGEEISSAEALKRAGIS-GPFELQAKEGLALVNGTAVGSAVAATVCFD	266
Es6cPAL5-8	LTGRHNSKVVTP EGEEISSAEALKRAGIS-GPFELQAKEGLALVNGTAVGSAVAATVCFD	266
Es6dPAL3	LTGRPNKAVGPDREPLNAKEAFCLAGITSGFFQLRPK EGLALVNSTAVGSGLAAMVLF E	267
Es6dPAL4-10	LTGRPNKAVGPAGETLTAKQAFELAGISGGFFELQPK EGLALVNGTGVGSALAAIVLFE	281
Es6dPAL4-3	LTGRPNKAVGPAGETLTAKQAFELAGISGGFFELQPK EGLALVNGTGVGSALAAIVLFE	283
Es6dPAL5	LTGRHNSKVVTP EGEEISSAEALKRAGIS-GPFELQAKEGLALVNGTAVGSAVAATVCFD	266
Es8cPAL4-16	LTGRPNKAVGPAGETLTAKQAFELAGISGGFFELQPK EGLALVNGTGVGSALAAIVLFE	283
Es8dPAL3	LTGRPNKAVGPDREPLNAKEAFCLAGITSGFFQLRPK EGLALVNSTAVGSGLAAMVLF E	267
Es8dPAL4-10	LTGRPNKAVGPAGETLTAKQAFELAGISGGFFELQPK EGLALVNGTGVGSALAAIVLFE	283
Es8dPAL4-11	LTGRPNKAVGPAGETLTAKQAFELAGISGGFFELQPK EGLALVNGTGVGSALAAIVLFE	282
Es8dPAL4-37	LTGRPNKAVGPAGETLTAKQAFELAGISGGFFELQPK EGLALVNGTGVGSALAAIVLFE	282
Es8dPAL4-45	LTGRPNKAVGPAGETLTAKQAFELAGISGGFFELQPK EGLALVNGTGVGSALAAIVLFE	283
Es8dPAL5	LTGRHNSKVVTP EGEEISSAEALKRAGIS-GPFELQAKEGLALVNGTAVGSAVAATVCFD	266
NtaPAL1	LTGRPNKAVGPNGETLNAEEAFRVAGVNGGFFELQPK EGLALVNGTAVGSGMAMVLF E	274
PtrPAL1	LTGRPNKATGPNGEVLDVAEAFKAAGIDSGFFELQPK EGLALVNGTAVGSGLASMVLF E	273

**** *:*. * : : : *: ** : * *:*.*****:*.t.***.**: * :

■ L: Leucine : 基質の結合に必要

■ N: Asparagine : 基質の結合に必要

附图 1. クローニングした *EsPAL* から予想されるアミノ酸配列アライメント (つづき)

Fig. S1. Continued

At: *A. thaliana*, Egr: *E. grandis*, Er: *E. robusta*, Nta: *N. tabacum*, Ptr: *P. trichocarpa*, Es4: *E. saligna* (20483), Es6: *E. saligna* (20675), Es8: *E. saligna* (20835)

AtPAL1	TNVLVLAELLSAVFAEVMGKPEFTDHLTHRLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYMKLAQ	344
AtPAL2	ANVQAVLAELVLSAIFAEVMSGKPEFTDHLTHRLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYMKLAQ	336
EgrPAL1	TNILAVLSEILSAIFAEVLMQKPEFTDHLTHKLKHHPGQIESAAIMEHILDGSAYVKAQ	327
EgrPAL2	ANILALLAETLSAMFCEAMHGKPEFTDPLTHLLKHHPGQIEAASLMEYLLNGSEYMKEAK	326
EgrPAL3	ANILAVLSEVLSAIFAEVMQKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYVKAQ	333
EgrPAL4	ANILAVLSEVLSAIFAEVMQKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYVKAQ	333
EgrPAL5	VNIQAVLSEVLSAIFAEVMQKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYVKAQ	333
EgrPAL6	ANILAVLSEVLSAIFAEVMQKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYVKAQ	333
EgrPAL7	ANILAVLSEVLSAIFAEVMQGNPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYVKAQ	333
EgrPAL8	ANMLTVLSEVLSAIFAEVMQKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYVKAQ	343
EgrPAL9	ANILAVLSEVLSAIFAEVMQKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSAYVKAQ	334
ErPAL1	ANILAVLSEVLSAIFAEVMQKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSAYVKAQ	334
Es4cPAL4-13	ANMLTVLSEVLSAIFAEVMQKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYVKAQ	337
Es4cPAL4-15	ANMLTVLSEVLSAIFAEVMQKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYVKAQ	342
Es4cPAL4-19	ANMLTVLSEVLSAIFAEVMQKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYVKAQ	342
Es4cPAL4-20	ANMLTVLSEVLSAIFAEVMQKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYVKAQ	343
Es4dPAL3	TNILAVLSEILSAIFAEVLMQKPEFTDHLTHKLKHHPGQIESAAIMEHILDGSAYVKAQ	327
Es4dPAL4-1	ANMLTVLSEVLSAIFAEVMQKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYVKAQ	342
Es4dPAL4-2	ANMLTVLSEVLSAIFAEVMQKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYVKAQ	343
Es4dPAL5-14	ANILALLAETLSAMFCEAMHGKPEFTDPLTHLLKHHPGQIEAASLMEYLLNGSEYMKEAK	327
Es4dPAL5-15	ANILALLAETLSAMFCEAMHGKPEFTDPLTHLLKHHPGQIEAASLMEYLLNGSEYMKEAK	326
Es4dPAL5-64	ANILALLAETLSAMFCEAMHGKPEFTDPLTHLLKHHPGQIEAASLMEYLLNGSEYMKEAK	326
Es4dPAL5-65	ANILALLAETLSAMFCEAMHGKPEFTDPLTHLLKHHPGQIEAASLMEYLLNGSEYMKEAK	327
Es4dPAL5-67	ANILALLAETLSAMFCEAMHGKPEFTDPLTHLLKHHPGQIEAASLMEYLLNGSEYMKEAK	326
Es6cPAL1	ANILAVLSEVLSAIFAEVMQKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSAYVKAQ	334
Es6cPAL4-2	ANMLTVLSEVLSAIFAEVMQKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYVKAQ	343
Es6cPAL5-14	ANILALLAETLSAMFCEAMRGKPEFTDPLTHLLKHHPGQIEAASLMEYLLNGSEYMKEAK	326
Es6cPAL5-17	ANILALLAETLSAMFCEAMRGKPEFTDPLTHLLKHHPGQIEAASLMEYLLNGSEYMKEAK	326
Es6cPAL5-2	ANILALLAETLSAMFCEAMHGKPEFTDPLTHLLKHHPGQIEAASLMEYLLNGSEYMKEAK	326
Es6cPAL5-22	ANILALLAETLSAMFCEAMRGKPEFTDPLTHLLKHHPGQIEAASLMEYLLNGSEYMKEAK	326
Es6cPAL5-26	ANILALLAETLSAMFCEAMRGKPEFTDPLTHLLKHHPGQIEAASLMEYLLNGSEYMKEAK	326
Es6cPAL5-8	ANILALLAETLSAMFCEAMHGKPEFTDPLTHLLKHHPGQIEAASLMEYLLNGSEYMKEAK	326
Es6dPAL3	TNILAVLSEILSAIFAEVLMQKPEFTDHLTHKLKHHPGQIESAAIMEHILDGSAYVKAQ	327
Es6dPAL4-10	ANMLTVLSEVLSAIFAEVMQKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYVKAQ	341
Es6dPAL4-3	ANMLTVLSEVLSAIFAEVMQKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYVKAQ	343
Es6dPAL5	ANILALLAETLSAMFCEAMHGKPEFTDPLTHLLKHHPGQIEAASLMEYLLNGSEYMKEAK	326
Es8cPAL4-16	ANMLTVLSEVLSAIFAEVMQKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYVKAQ	343
Es8dPAL3	TNILAVLSEILSAIFAEVLMQKPEFTDHLTHKLKHHPGQIESAAIMEHILDGSAYVKAQ	327
Es8dPAL4-10	ANMLTVLSEVLSAIFAEVMQKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYVKAQ	343
Es8dPAL4-11	ANMLTVLSEVLSAIFAEVMQKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYVKAQ	342
Es8dPAL4-37	ANMLTVLSEVLSAIFAEVMQKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYVKAQ	342
Es8dPAL4-45	ANMLTVLSEVLSAIFAEVMQKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYVKAQ	343
Es8dPAL5	ANILALLAETLSAMFCEAMHGKPEFTDPLTHLLKHHPGQIEAASLMEYLLNGSEYMKEAK	326
NtaPAL1	SNILAVMSEVLSAIFAEVMNGKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYVKAQ	334
PtrPAL1	TNVLAVLSEILSAIFAEVMNGKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYMKAAQ	333

* : : : : * : * : * . * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

図1. クローニングした *EsPAL* から予想されるアミノ酸配列アライメント (つづき)

Fig. S1. Continued

At: *A. thaliana*, *Egr*: *E. grandis*, *Er*: *E. robusta*, *Nta*: *N. tabacum*, *Ptr*: *P. trichocarpa*, *Es4*: *E. saligna* (20483), *Es6*: *E. saligna* (20675), *Es8*: *E. saligna* (20835)

AtPAL1	KLHEMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRYATKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKAI	404
AtPAL2	KVHEMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRQATKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKAI	396
EgrPAL1	KLPEFDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPLIEVIRYSTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKVL	387
EgrPAL2	LRHEKDPLTKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRAATHSIEREINSVNDNPLIDVARDLAL	386
EgrPAL3	KLHEMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRAATKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKAL	393
EgrPAL4	KLHEMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRAATKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKAL	393
EgrPAL5	KLHEIDPLQKPKKDRYALRTSPQWLGPIEVIRAATKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKAL	393
EgrPAL6	KVHEIDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRAATKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKAL	393
EgrPAL7	KLHEIDPLQKPKKDRYALRTSPQWLGPIEVIRAATKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKAL	393
EgrPAL8	KLHDMMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRASTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKAL	403
EgrPAL9	KLHEMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRAATKMIEREINSVNDNPLIDVARNKAL	394
ErPAL1	KLHEMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRAATKMIEREINSVNDNPLIDVARNKAL	394
Es4cPAL4-13	KLHDMMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRASTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKAL	397
Es4cPAL4-15	KLHETDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRASTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKAL	402
Es4cPAL4-19	KLHDMMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRASTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKAL	402
Es4cPAL4-20	KLHETDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRASTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKAL	403
Es4dPAL3	KLPEFDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPLIEVIRYSTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKVL	387
Es4dPAL4-1	RLHDMMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRASTKSTEREINSVNDNPLIDVSRNKAL	402
Es4dPAL4-2	KLHETDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRASTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKAL	403
Es4dPAL5-14	LRHEKDPLTKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRAATHSIEREINSVNDNPLIDVARDLAL	387
Es4dPAL5-15	LRHEKDPLTKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRAATHSIEREINSVNDNPLIDVARDLAL	386
Es4dPAL5-64	LRHEKDPLTKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRAATHSIEREINSVNDNPLIDVARDLAL	386
Es4dPAL5-65	LRHEKDPLTKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRAATHSIEREINSVNDNPLIDVARDLAL	387
Es4dPAL5-67	LRHEKDPLTKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRAATHSIEREINSVNDNPLIDVARDLAL	386
Es6cPAL1	KLHEMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRAATKMIEREINSVNDNPLIDVARNKAL	394
Es6cPAL4-2	KLHDMMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRASTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKAL	403
Es6cPAL5-14	LRHEKDPLTKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRAATHSIEREINSVNDNPLIDVARDLAL	386
Es6cPAL5-17	LRHEKDPLTKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRAATHSIEREINSVNDNPLIDVARDLAL	386
Es6cPAL5-2	LRHEKDPLTKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRAATHSIEREINSVNDNPLIDVARDLAL	386
Es6cPAL5-22	LRHEKDPLTKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRAATHSIEREINSVNDNPLIDVARDLAL	386
Es6cPAL5-26	LRHEKDPLTKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRAATHSIEREINSVNDNPLIDVARDLAL	386
Es6cPAL5-8	LRHEKDPLTKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRAATHSIEREINSVNDNPLIDVARDLAL	386
Es6dPAL3	KLPEFDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPLIEVIRYSTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKVL	387
Es6dPAL4-10	KLHDMMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRASTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKAL	401
Es6dPAL4-3	KLHDMMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRASTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKAL	403
Es6dPAL5	LRHEKDPLTKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRAATHSIEREINSVNDNPLIDVARDLAL	386
Es8cPAL4-16	KLHDMMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRASTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKAL	403
Es8dPAL3	KLPEFDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPLIEVIRYSTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKVL	387
Es8dPAL4-10	KLHDMMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRASTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKAL	403
Es8dPAL4-11	KLHDMMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRASTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKAL	402
Es8dPAL4-37	KLHDMMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRASTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKAL	402
Es8dPAL4-45	KLHDMMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRASTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKAL	403
Es8dPAL5	LRHEKDPLTKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRAATHSIEREINSVNDNPLIDVARDLAL	386
NtaPAL1	KLHEMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRAATKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKAL	394
PtrPAL1	KLHEMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPIEVIRFSTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKAL	393

■ Y : Tyrosine : プロトンの放出に関わる

■ D : Aspartic acid : PAL 活性に重要

■ N : Asparagine : 基質の結合に必要

図1. クローニングした *EsPAL* から予想されるアミノ酸配列アライメント (つづき)
Fig. S1. Continued

At: *A. thaliana*, *Egr*: *E. grandis*, *Er*: *E. robusta*, *Nta*: *N. tabacum*, *Ptr*: *P. trichocarpa*, *Es4*: *E. saligna* (20483),
Es6: *E. saligna* (20675), *Es8*: *E. saligna* (20835)

AtPAL1	HGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLTAARNPSLDYGF	464
AtPAL2	HGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLTAARNPSLDYGF	456
EgrPAL1	HGGNFQGTPI TVAMDSTRLIAIASIGKLMFAQFSELVNHFYNNGLPSNLTAARNPSLDYGF	447
EgrPAL2	HGGNFQGTPIGVSMNLRIALAAIGKLLFAQFSELVCDYNNGLPSNLSAGPNPSLDYGL	446
EgrPAL3	HGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGF	453
EgrPAL4	HGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGF	453
EgrPAL5	HGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGF	453
EgrPAL6	HGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGF	453
EgrPAL7	HGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGF	453
EgrPAL8	HGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGF	463
EgrPAL9	HGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGF	454
ErPAL1	HGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGF	454
Es4cPAL4-13	HGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGF	457
Es4cPAL4-15	HGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGF	462
Es4cPAL4-19	HGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGF	462
Es4cPAL4-20	HGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGF	463
Es4dPAL3	HGGNFQGTPI TVAMDSTRLIAIASIGKLMFAQFSELVNHFYNNGLPSNLTAARNPSLDYGF	447
Es4dPAL4-1	HGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGF	462
Es4dPAL4-2	HGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGF	463
Es4dPAL5-14	HGGNFQGTPIGVSMNLRIALAAIGKLLFAQFSELVCDYNNGLPSNLSAGPNPSLDYGL	447
Es4dPAL5-15	HGGNFQGTPIGVSMNLRIALAAIGKLLFAQFSELVCDYNNGLPSNLSAGPNPSLDYGL	446
Es4dPAL5-64	HGGNFQGTPIGVSMNLRIALAAIGKLLFAQFSELVCDYNNGLPSNLSAGPNPSLDYGL	446
Es4dPAL5-65	HGGNFQGTPIGVSMNLRIALAAIGKLLFAQFSELVCDYNNGLPSNLSAGPNPSLDYGL	447
Es4dPAL5-67	HGGNFQGTPIGVSMNLRIALAAIGKLLFAQFSELVCDYNNGLPSNLSAGPNPSLDYGL	446
Es6cPAL1	HGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGF	454
Es6cPAL4-2	HGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGF	463
Es6cPAL5-14	HGGNFQGTPIGVSMNLRIALAAIGKLLFAQFSELVCDYNNGLPSNLSAGPNPSLDYGL	446
Es6cPAL5-17	HGGNFQGTPIGVSMNLRIALAAIGKLLFAQFSELVCDYNNGLPSNLSAGPNPSLDYGL	446
Es6cPAL5-2	HGGNFQGTPIGVSMNLRIALAAIGKLLFAQFSELVCDYNNGLPSNLSAGPNPSLDYGL	446
Es6cPAL5-22	HGGNFQGTPIGVSMNLRIALAAIGKLLFAQFSELVCDYNNGLPSNLSAGPNPSLDYGL	446
Es6cPAL5-26	HGGNFQGTPIGVSMNLRIALAAIGKLLFAQFSELVCDYNNGLPSNLSAGPNPSLDYGL	446
Es6cPAL5-8	HGGNFQGTPIGVSMNLRIALAAIGKLLFAQFSELVCDYNNGLPSNLSAGPNPSLDYGL	446
Es6dPAL3	HGGNFQGTPI TVAMDSTRLIAIASIGKLMFAQFSELVNHFYNNGLPSNLTAARNPSLDYGF	447
Es6dPAL4-10	HGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGF	461
Es6dPAL4-3	HGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGF	463
Es6dPAL5	HGGNFQGTPIGVSMNLRIALAAIGKLLFAQFSELVCDYNNGLPSNLSAGPNPSLDYGL	446
Es8cPAL4-16	HGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGF	463
Es8dPAL3	HGGNFQGTPI TVAMDSTRLIAIASIGKLMFAQFSELVNHFYNNGLPSNLTAARNPSLDYGF	447
Es8dPAL4-10	HGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGF	463
Es8dPAL4-11	HGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGF	462
Es8dPAL4-37	HGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGF	462
Es8dPAL4-45	HGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGF	463
Es8dPAL5	HGGNFQGTPIGVSMNLRIALAAIGKLLFAQFSELVCDYNNGLPSNLSAGPNPSLDYGL	446
NtaPAL1	HGGNFQGTPIGVSMNRLALASIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLTAARNPSLDYGF	454
PtrPAL1	HGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAAIGKLLFAQFSELVNDFYNNGLPSNLTAARNPSLDYGF	453

* *****: *:*. *:*. *:*. *:*. *:*. ***** .:*****:.. *****:

■ F: Phenylalanine : 基質の結合に必要

附图 1. クローニングした *EsPAL* から予想されるアミノ酸配列アライメント (つづき)

Fig. S1. Continued

At: *A. thaliana*, Egr: *E. grandis*, Er: *E. robusta*, Nta: *N. tabacum*, Ptr: *P. trichocarpa*, Es4: *E. saligna* (20483), Es6: *E. saligna* (20675), Es8: *E. saligna* (20835)

AtPAL1	KGAEIAMASYCSELQYLANPVTSHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTSEAVDILKLMSTTF	524
AtPAL2	KGAEIAMASYCSELQYLANPVTSHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTSEAVDILKLMSTTF	516
EgrPAL1	KGAEIAMASYCSELQFLANPVTINHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILQFMSTTF	507
EgrPAL2	KGAEIAMAAACSELQYLANPVTTHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILKLMSTTY	506
EgrPAL3	KGAEIAMASYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVDVLKLMSTTF	513
EgrPAL4	KGAEIAMASYCSELQFLANPVTNHVESAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVDVLKLMSTTF	513
EgrPAL5	KGAEIAMASYCSELQFLANPVTNHVESAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVDVLKLMSTTF	513
EgrPAL6	KGAEIAMASYCSELQFLANPVTNHVESAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVDVLKLMSTTF	513
EgrPAL7	KGAEIAMASYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVDVLKLMSTTF	513
EgrPAL8	KGAEITMAAYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILQLMSSAF	523
EgrPAL9	KGAEIAMASYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILKLMSTTF	514
ErPAL1	KGAEIAMASYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILKLMSTTF	514
Es4cPAL4-13	KGAEITMAAYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILQLMSSAF	517
Es4cPAL4-15	KGAEITMAAYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILQLMSSAF	522
Es4cPAL4-19	KGAEITMAAYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILQLMSSAF	522
Es4cPAL4-20	KGAEITMAAYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILQLMSSAF	523
Es4dPAL3	KGAEIAMASYCSELQFLANPVTINHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILQFMSTTF	507
Es4dPAL4-1	KGAEITMAAYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILQLMSSAF	522
Es4dPAL4-2	KGAEITMAAYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILQLMSSAF	523
Es4dPAL5-14	KGAEIAMAAYCSELQYLANPVTTHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILKLMSTTY	507
Es4dPAL5-15	KGAEIAMAAYCSELQYLANPVTTHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILKLMSTTY	506
Es4dPAL5-64	KGAEIAMAAYCSELQYLANPVTTHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILKLMSTTY	506
Es4dPAL5-65	KGAEIAMAAYCSELQYLANPVTTHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILKLMSTTY	507
Es4dPAL5-67	KGAEIAMAAYCSELQYLANPVTTHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILKLMSTTY	506
Es6cPAL1	KGAEIAMASYCSELQFLANPVTINHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILQFMSTTF	514
Es6cPAL4-2	KGAEITMAAYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILQLMSSAF	523
Es6cPAL5-14	KGAEIAMAAYCSELQYLANPVTTHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILKLMSTTY	506
Es6cPAL5-17	KGAEIAMAAYCSELQYLANPVTTHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILKLMSTTY	506
Es6cPAL5-2	KGAEIAMAAYCSELQYLANPVTTHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILKLMSTTY	506
Es6cPAL5-22	KGAEIAMAAYCSELQYLANPVTTHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILKLMSTTY	506
Es6cPAL5-26	KGAEIAMAAYCSELQYLANPVTTHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILKLMSTTY	506
Es6cPAL5-8	KGAEIAMAAYCSELQYLANPVTTHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILKLMSTTY	506
Es6dPAL3	KGAEIAMASYCSELQFLANPVTINHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILQFMSTTF	507
Es6dPAL4-10	KGAEIAMAAYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILQLMSSAF	521
Es6dPAL4-3	KGAEITMAAYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILQLMSSAF	523
Es6dPAL5	KGAEIAMAAYCSELQYLANPVTTHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILKLMSTTY	506
Es8cPAL4-16	KGAEITMAAYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILQLMSSAF	523
Es8dPAL3	KGAEIAMASYCSELQFLANPVTINHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILQFMSTTF	507
Es8dPAL4-10	KGAEITMAAYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILQLMSSAF	523
Es8dPAL4-11	KGAEITMAAYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILQLMSSAF	522
Es8dPAL4-37	KGAEITMAAYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILQLMSSAF	522
Es8dPAL4-45	KGAEITMAAYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILQLMSSAF	523
Es8dPAL5	KGAEIAMAAYCSELQYLANPVTTHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILKLMSTTY	506
NtaPAL1	KGAEIAMASYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVDILKLMSTTF	514
PtrPAL1	KGAEIAMASYCSELQYLANPVTSHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVDILKLMSTTF	513
	*****:**:*****:***** **:*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:	

- N: Asparagine : 基質の結合に必要
- G: Glycine : 活性部位の中心に位置する

附図 1. クローニングした *EsPAL* から予想されるアミノ酸配列アライメント (つづき)

Fig. S1. Continued

At: *A. thaliana*, Egr: *E. grandis*, Er: *E. robusta*, Nta: *N. tabacum*, Ptr: *P. trichocarpa*, Es4: *E. saligna* (20483),
Es6: *E. saligna* (20675), Es8: *E. saligna* (20835)

AtPAL1	LVAICQAVDLRHLEENLRQTVKNTVSQVAKKVLTTGVNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREQV	584
AtPAL2	LVGICQAVDLRHLEENLRQTVKNTVSQVAKKVLTTG INGELHPSRFCEKDLLKVVVDREQV	576
EgrPAL1	LVALCQAVDLRHLEENLKS AVKSAVSQVAKRTLTTASDGELHPSTFCEKDLLKVVVDREHV	567
EgrPAL2	MVALCQAIDLRHLEENMREAVKRSVLQAVKKTLYMSEDGLLLESRFCEKELLQVVEHEPV	566
EgrPAL3	LVALCQAIDLRHLEENLKS VVKNTVNQVAKKVLYVGSNGELHPSRFSEKDLIKVVVDREYV	573
EgrPAL4	LVALCQAIDLRHLEENLKS VVKSTVNQVAKKVLYVGSNGELHPSRFSEKDLIKVVVDREHV	573
EgrPAL5	LVALCQAIDLRHLEENLKS VVKNTVNQVAKKVLYVGSNGELHPSRFSEKDLIKVVVDREHV	573
EgrPAL6	LVALCQAIDLRHLEENLKS VVKNTVNQVAKKVLYVGSNGELHPSRFSEKDLIKVVVDREHV	573
EgrPAL7	LVALCQAIDLRHLEENLKS VVKNTVNQVAKKVLYVGSNDELHPSRFSEKDLIKVVVDREYV	573
EgrPAL8	LVALCQAIDLRHLEENLKS TVKNTV SQI AKK VLTMG PNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREHV	583
EgrPAL9	LVALCQAVDLRHLEENLKS TVKNTV GRVARK VLMV GAN GELHPSHY CERD LKVVVDREHV	574
ErPAL1	LVALCQAVDLRHLEENLKS TVKNTV GRVARK VLMV GAN GELHPSHY CERD LKVVVDREHV	574
Es4cPAL4-13	LVALCQAIDLRHLEENLKS TVKNTV SQVAKK VLTMG PNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREHV	577
Es4cPAL4-15	LVALCQAIDLRHLEENLKS TVKNTV SQVAKK VLTMG PNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREHV	582
Es4cPAL4-19	LVALCQAIDLRHLEENLKS TVKNTV SQVAKK VLTMG PNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREHV	582
Es4cPAL4-20	LVALCQAIDLRHLEENLKS TVKNTV SQVAKK VLTMG PNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREHV	583
Es4dPAL3	LVALCQAIDLRHLEENLKS AVKSAVSQVAKRTLTTASDGELHPSRFCEKELLQVVEHEPV	567
Es4dPAL4-1	LVALCQAIDLRHLEENLKS TVKNTV SQVAKK VLTMG PNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREHV	582
Es4dPAL4-2	LVALYQAIDLRHLEENLESTVKNTVSQVAKK VLTMG PNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREHV	583
Es4dPAL5-14	MVALCQAIDLRHLEENMREAVKRSVLQAVKKTLYMSEDGLLLESRFCEKELLQVVEHEPV	567
Es4dPAL5-15	MVALCQAIDLRHLEENMREAVKRSVLQAVKKTLYMSEDGLLLESRFCEKELLQVVEHEPV	566
Es4dPAL5-64	MVALCQAIDLRHLEENMREAVKRSVLQAVKKTLYMSEDGLLLESRFCEKELLQVVEHEPV	566
Es4dPAL5-65	MVALCQAIDLRHLEENMREAVKRSVLQAVKKTLYMSEDGLLLESRFCEKELLQVVEHEPV	567
Es4dPAL5-67	MVALCQAIDLRHLEENMREAVKRSVLQAVKKTLYMSEDGLLLESRFCEKELLQVVEHEPV	566
Es6cPAL1	LVALCQAVDLRHLEENLKS TVKNTV GRVARK VLMV GAN GELHPSRFCEKDLLKVVVDREHV	574
Es6cPAL4-2	LVALCQAIDLRHLEENLKS TVKNTV SQVAKK VLTMG PNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREHV	583
Es6cPAL5-14	MVALCQAIDLRHLEENMREAVKRSVLQAVKKTLYMSEDGLLLESRFCEKELLQVVEHEPV	566
Es6cPAL5-17	MVALCQAIDLRHLEENMREAVKRSVLQAVKKTLYMSEDGLLLESRFCEKELLQVVEHEPV	566
Es6cPAL5-2	MVALCQAIDLRHLEENMREAVKRSVLQAVKKTLYMSEDGLLLESRFCEKELLQVVEHEPV	566
Es6cPAL5-22	MVALCQAIDLRHLEENMREAVKRSVLQAVKKTLYMSEDGLLLESRFCEKELLQVVEHEPV	566
Es6cPAL5-26	MVALCQAIDLRHLEENMREAVKRSVLQAVKKTLYMSEDGLLLESRFCEKELLQVVEHEPV	566
Es6cPAL5-8	MVALCQAIDLRHLEENMREAVKRSVLQAVKKTLYMSEDGLLLESRFCEKELLQVVEHEPV	566
Es6dPAL3	LVALCQAVDLRHLEENLKS AVKSAVSQVAKRTLTTASDGELHPSTFCEKDLLKVVVDREHV	567
Es6dPAL4-10	LVALCQAMDLRHLEENLKS TVKNTV SQVAKK VLTMG PNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREHV	581
Es6dPAL4-3	LVALCQAIDLRHLEENLKS TVKNTV SQVAKK VLTMG PNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREHV	583
Es6dPAL5	MVALCQAIDLRHLEENMREAVKRSVLQAVKKTLYMSEDGLLLESRFCEKELLQVVEHEPV	566
Es8cPAL4-16	LVALCQAIDLRHLEENLKS TVKNTV SQVAKK VLTMG PNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREHV	583
Es8dPAL3	LVALCQAVDLRHLEENLKS AVKSAVSQVAKRTLTTASDGELHPSTFCEKDLLKVVVDREHV	567
Es8dPAL4-10	LVALCQAIDLRHLEENLKS TVKNTV SQVAKK VLTMG PNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREHV	583
Es8dPAL4-11	LVALCQAIDLRHLEENLKS TVKNTV SQVAKK VLTMG PNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREHV	582
Es8dPAL4-37	LVALCQAIDLRHLEENLKS TVKNTV SQVAKK VLTMG PNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREHV	582
Es8dPAL4-45	LVALCQAIDLRHLEENLKS TVKNTV SQVAKK VLTMG PNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREHV	583
Es8dPAL5	MVALCQAIDLRHLEENMREAVKRSVLQAVKKTLYMSEDGLLLESRFCEKELLQVVEHEPV	566
NtaPAL1	LVALCQAIDLRHLEENLKS AVKNTV SQVAKRTLTTMGANGELHPPARFCEKELLRIVDREYL	574
PtrPAL1	LVALCQAIDLRHLEENLKS AVKNTV SHVSKR VLT TG AN GELHPSRFCEKELLKVVVDREDV	573

附图 1. クローニングした *EsPAL* から予想されるアミノ酸配列アライメント (つづき)

Fig. S1. Continued

At: *A. thaliana*, Egr: *E. grandis*, Er: *E. robusta*, Nta: *N. tabacum*, Ptr: *P. trichocarpa*, Es4: *E. saligna* (20483), Es6: *E. saligna* (20675), Es8: *E. saligna* (20835)

AtPAL1	YTYADDPCSATYPLIQKLRQVIVDHALINGESEKNAVST--SIFHKIGAFEEELKAVLPKE	642
AtPAL2	FTYVDDPCSATYPLMQRLRQVIVDHALSNGETEKNAVST--SIFQKIGAFEEELKAVLPKE	634
EgrPAL1	FTYVDDPCRAASPLMERLRQVLVEHALSNGESQKNSST--SIFHKIGVFEAELKAVLPKE	625
EgrPAL2	FSYLDDPANPSYVLLPKLQEVLVTRALKDPKTEDASENGYSIFKRIPIFIEELKARLEEE	626
EgrPAL3	FAYIDDDPCSATYPLMQKLRQVLVDDALDDVDREKNPST--SIFQKIGAFEEELKALLPKE	631
EgrPAL4	FAYIDDDPCSATYPLMQTLRQVLVDHALDDVDREKNPST--SIFQKIGAFEEQLKALLPKE	631
EgrPAL5	FAYIDDDPCSATYPLMQTLRQVLVDHALDDVDREKNPST--SIFQKIGAFEEQLKALLPKE	631
EgrPAL6	FAYIDDDPCSATYPLMQKLRQVLVDHALDDVDREKNPST--SIFQKIGAFEEQLKALLPKE	631
EgrPAL7	FAYIDDDPCSATYPLMQKLRQVLVDDALDDVDREKNPST--SIFQKIGVFEAELKALLPKE	631
EgrPAL8	FAYIDDDPCSATYPLMQKLRQVLVDHALANGD-EVKANS--SIFLKI GTFEEELKALLPKE	640
EgrPAL9	FTYADDACSATYPLMQKLRQVLVDQALVNGESELNPST--SIFQKIVAFEEELKAQLPKD	632
ErPAL1	FTYADDACSATYPLMQKLRQVLVDQALVNGESELNPST--SIFQKIVAFEEELKAQLPKD	632
Es4cPAL4-13	FAYIDDDPCSATYPLMQKLRQVLVDHALANSD-EVKANS--SIFLKI GTFEEELKALLPKE	634
Es4cPAL4-15	FAYIDDDPCSATYPLMQKLRQVLVDHALANGD-EVKANS--SIFLKI GTFEEELKALLPKE	639
Es4cPAL4-19	FAYIDDDPCSATYPLMQKLRQVLVDHALANSD-EVKANS--SIFLKI GTFEEELKALLPKE	639
Es4cPAL4-20	FAYIDDDPCSATYPLMQKLRQVLVDHALANSD-EVKANS--SIFLKI GTFEEELKALLPKE	640
Es4dPAL3	FTYVDDPCRAASPLMERLRQVLVEHALSNGESQKNSST--SIFHKIGVFEAELKAVLPKE	625
Es4dPAL4-1	FAYIDDDPCSATYPLMQKLRQVLVDHALANSD-EVKANS--SIFLKI GTFEEELKALLPKE	639
Es4dPAL4-2	FAYIDDDPCSATYPLMQKLRQVLVDHALANSD-EVKANS--SIFLKI GTFEEELKALLPKE	640
Es4dPAL5-14	FSYLDDPANPSYVLLPKLQEVLVTRAIKDPKTEDASENGYSIFKRIPIFIEELKARLEEE	627
Es4dPAL5-15	FSYLDDPANPSYVLLPKLQEVLVTRAIKDPKTEDARENGYSIFKRIPIFIEELKARLEEE	626
Es4dPAL5-64	FSYLDDPANPSYVLLPKLQEVLVTRAIKDPKTEDARENGYSIFKRIPIFIEELKARLEEE	626
Es4dPAL5-65	FSYLDDPANPSYVLLPKLQEVLVTRAIKDPKTEDASENGYSIFKRIPIFIEELKARLEEE	627
Es4dPAL5-67	FSYLDDPANPSYVLLPKLQEVLVTRAIKDPKTEDASENGYSIFKRIPIFIEELKARLEEE	626
Es6cPAL1	FTYADDACSATYPLMQKLRQVLVDQALVNGESELNPST--SIFQKIVAFEEELKAQLPKD	632
Es6cPAL4-2	FAYIDDDPCSATYPLMQKLRQVLVDHALANGD-EVKANS--SIFLKI GTFEEELKALLPKE	640
Es6cPAL5-14	FSYLDDPANPSYVLLPKLQEVLVTRAIKDPKTEDASENGYSIFKRIPIFIEELKARLEEE	626
Es6cPAL5-17	FSYLDDPANPSYVLLPKLQEVLVTRAIKDPKTEDASENGYSIFKRIPIFIEELKARLEEE	626
Es6cPAL5-2	FSYLDDPANPSYVLLPKLQEVLVTRAIKDPKTEDASENGYSIFKRIPIFIEELKARLEEE	626
Es6cPAL5-22	FSYLDDPANPSYVLLPKLQEVLVTRAIKDPKTEDASENGYSIFKRIPIFIEELKARLEEE	626
Es6cPAL5-26	FSYLDDPANPSYVLLPKLQEVLVTRAIKDPKTEDASENGYSIFKRIPIFIEELKARLEEE	626
Es6cPAL5-8	FSYLDDPANPSYVLLPKLQEVLVTRAIKDPKTEDASENGYSIFKRIPIFIEELKARLEEE	626
Es6dPAL3	FTYVDDPCRAASPLMERLRQVLVEHALSNGESQKNSST--SIFHKIGVFEAELKAVLPKE	625
Es6dPAL4-10	FAYIDDDPCSATYPLMQKLRQVLVDHALANGD-EVKANS--SIFLKI GTFEEELKALLPKE	638
Es6dPAL4-3	FAYIDDDPCSATYPLMQKLRQVLVDHALANGD-EVKANS--SIFLKI GTFEEELKALLPKE	640
Es6dPAL5	FSYLDDPANPSYVLLPKLQEVLVTRALKDPKTEDASENGYSIFKRIPIFIEELKARLEEE	626
Es8cPAL4-16	FAYIDDDPCSATYPLMQKLRQVLVDHALANGD-EVKANS--SIFLKI GTFEEELKALLPKE	640
Es8dPAL3	FTYVDDPCRAASPLMERLRQVLVEHALSNGESQKNSST--SIFHKIGVFEAELKAVLPKE	625
Es8dPAL4-10	FAYIDDDPCSATYPLMQKLRQVLVDHALANGD-EVKANS--SIFLKI GTFEEELKALLPKE	640
Es8dPAL4-11	FAYIDDDPCSATYPLMQKLRQVLVDHALANGD-EVKANS--SIFLKI GTFEEELKALLPKE	639
Es8dPAL4-37	FAYIDDDPCSATYPLMQKLRQVLVDHALANGD-EVKANS--SIFLKI GTFEEELKALLPKE	639
Es8dPAL4-45	FAYIDDDPCSATYPLMQKLRQVLVDHALANGD-EVKANS--SIFLKI GTFEEELKALLPKE	640
Es8dPAL5	FSYLDDPANPSYVLLPKLQEVLVTRALKDPKTEDASENGYSIFKRIPIFIEELKARLEEE	626
NtaPAL1	FAYADDPCSCNYPLMQKLRQVLVDHAMNGESEKNVNS--SIFQKIGAFEDDELKAVLPKE	632
PtrPAL1	FAYADDPCSATYPLMQKLRQVLVDHALANGENEKNTST--SVFQKITAFEEELKALLPKE	631
	::* **.. * : **:* * : : . . * : * * * ** * : ** * : *	

附图 1. クローニングした *EsPAL* から予想されるアミノ酸配列アライメント (つづき)

Fig. S1. Continued

At: *A. thaliana*, Egr: *E. grandis*, Er: *E. robusta*, Nta: *N. tabacum*, Ptr: *P. trichocarpa*, Es4: *E. saligna* (20483), Es6: *E. saligna* (20675), Es8: *E. saligna* (20835)

AtPAL1	VEAARAAYDNGTSAI PNRIKECRSY PLYRFVREELGTELLTGEKVT SPGEEFDKVFTAIC	702
AtPAL2	VEAARAAYNGTAPI PNRIKECRSY PLYRFVREELGTKLLTGEKVSPGEEFDKVFTAMC	694
EgrPAL1	VESSRLTFESGNPTI PNKIKDCGSY PLYKFVREDLRTSLLTGERVSPGEEFDKVFKAMY	685
EgrPAL2	VPKARERFDGGEFGVENRIKNCRTY PVYRFVRSMDRTQLLSGAKKVPGEEIEKVYEAIN	686
EgrPAL3	VENARAQFESGNSAIANKIRGCRSY PLYRFVREELGTGLLTGEKVGSPGEDFDLVFSAMC	691
EgrPAL4	VENARAQFESGNSAIANKIRGCRSY PLYRFVREELGTGLLTGEKVGSPGEDFDLVFSAMC	691
EgrPAL5	VENARAQFESGSSAIANKIRGCRSY PLYRFVREELGTGLLTGEKVGSPGEDFDLVFSAMC	691
EgrPAL6	VENARAQFESGNSAIANKIRGCRSY PLYRFVREELGTGLLTGEKVGSPGEDFDLVFSAMC	691
EgrPAL7	VENARAQFESGNSAIANKIRGCRSY PLYRFVREELGTGLLTGEKVGSPGEDFDLVFSAMC	691
EgrPAL8	VDNCRSACESGNEAI PNRIECRSY PLYKFVRADLGTLLTGEKVRSPGEDFDEVFTAMC	700
EgrPAL9	VEGVRVQYETGNLAI PNQIKECRSY PLYKLVREELGTALLTGEGVI SPGEDFDKVFTAIC	692
ErPAL1	VEGIRVQYETGSLAI PNQIKECRSY PLYKLVREELGTALLTGEGVI SPGEDFDKVFTAIC	692
Es4cPAL4-13	VDNCRSACESGNEAI PNRIECRSY PLYKFVRADLGTLLTGEKVRSPGEDFDKVFTAMC	694
Es4cPAL4-15	VDNCRSACESGNEAI PNRIECRSY PLYKFVRADLGTLLTGEKVRSPGEDFDKVFTAMC	699
Es4cPAL4-19	VDNCRSACESGNEAI PNRIECRSY PLYKFVRADLGTLLTGEKVRSPGEDFDKVFTAMC	699
Es4cPAL4-20	VDNCRSACESGNEAI PNRIECRSY PLYKFVRADLGTLLTGEKVRSPGEDFDKVFTAMC	700
Es4dPAL3	VESSRLTFESGNPTI PNKIKDCGSY PLYKFVREDLRTSLLTGERVSPGEEFDKVFKAMY	685
Es4dPAL4-1	VDNCRSACESGNEAI PNRIECRSY PLYKFVRADLGTLLTGEKVRSPGEDFDKVFTAMC	699
Es4dPAL4-2	VDNCRSACESGNEAI PNRIECRSY PLYKFVRADLGTLLTGEKVRSPGEDFDKVFTAMC	700
Es4dPAL5-14	VPKARERFDGGEFGVENRIKNCRTY PVYRFVRSMDRTQLLSGAKKVPGEEIEKVYEAIN	687
Es4dPAL5-15	VPKARERFDGGEFGVENRIKNCRTY PVYRFVRSMDRTQLLSGAKKVPGEEIEKVYEAIN	686
Es4dPAL5-64	VPKARERFDGGEFGVENRIKNCRTY PVYRFVRSMDRTQLLSGAKKVPGEEIEKVYEAIN	686
Es4dPAL5-65	VPKARERFDGGEFGVENRIKNCRTY PVYRFVRSMDRTQLLSGAKKVPGEEIEKVYEAIN	687
Es4dPAL5-67	VPKARERFDGGEFGVENRIKNCRTY PVYRFVRSMDRTQLLSGAKKVPGEEIEKVYEAIN	686
Es6cPAL1	VEGVRVQYETGNLAI PNQIKECRSY PLYKLVREELGTALLTGEGVI SPGEDFDKVFTAIC	692
Es6cPAL4-2	VDNCRSACESGNEAI PNRIECRSY PLYKFVRADLGTLLTGEKVRSPGEDFDEVFTAMC	700
Es6cPAL5-14	VPKARERFDGGEFGLENRIKNCRTY PVYRFVRSMDRTQLLSGAKKVPGEEIEKVYEAIN	686
Es6cPAL5-17	VPKARERFDGGEFGLENRIKNCRTY PVYRFVRSMDRTQLLSGAKKVPGEEIEKVYEAIN	686
Es6cPAL5-2	VPKARERFDGGEFGLENRIKNCRTY PVYRFVRSMDRTQLLSGAKKVPGEEIEKVYEAIN	686
Es6cPAL5-22	VPKARERFDGGEFGLENRIKNCRTY PVYRFVRSMDRTQLLSGAKKVPGEEIEKVYEAIN	686
Es6cPAL5-26	VPKARERFDGGEFGLENRIKNCRTY PVYRFVRSMDRTQLLSGAKKVPGEEIEKVYEAIN	686
Es6cPAL5-8	VSKARERFDGGEFGLENRIKNCRTY PVYRFVRSMDRTQLLSGAKKVPGEEIEKVYEAIN	686
Es6dPAL3	VESSRLTFESGNPTI PNKIKDCGSY PLYKFVREDLRTSLLTGERVSPGEEFDKVFKAMY	685
Es6dPAL4-10	VDNCRSACESGNEAI PNRIECRSY PLYKFVRADLGTLLTGEKVRSPGEDFDEVFTAMC	698
Es6dPAL4-3	VDNCRSACESGNEAI PNRIECRSY PLYKFVRADLGTLLTGEKVRSPGEDFDEVFTAMC	700
Es6dPAL5	VPKARERFDGGEFGVENRIKNCRTY PVYRFVRSMDRTQLLSGAKKVPGEEIEKVYEAIN	686
Es8cPAL4-16	VDNCRSACESGNEAI PNRIECRSY PLYKFVRADLGTLLTGEKVRSPGEDFDEVFTAMC	700
Es8dPAL3	VESSRLTFESGNPTI PNKIKDCGSY PLYKFVREDLRTSLLTGERVSPGEEFDKVFKAMY	685
Es8dPAL4-10	VDNCRSACESGNEAI PNRIECRSY PLYKFVRADLGTLLTGEKVRSPGEDFDEVFTAMC	700
Es8dPAL4-11	VDNCRSACESGNEAI PNRIECRSY PLYKFVRADLGTLLTGEKVRSPGEDFDEVFTAMC	699
Es8dPAL4-37	VDNCRSACESGNEAI PNRIECRSY PLYKFVRADLGTLLTGEKVRSPGEDFDEVFTAMC	699
Es8dPAL4-45	VDNCRSACESGNEAI PNRIECRSY PLYKFVRADLGTLLTGEKVRSPGEDFDEVFTAMC	700
Es8dPAL5	VPKARERFDGGEFGVENRIKNCRTY PVYRFVRSMDRTQLLSGAKKVPGEEIEKVYEAIN	686
NtaPAL1	VESARAALSGNPAI PNRIECRSY PLYRFVRKELGTLLTGEKVRSPGEECDKVFTAMC	692
PtrPAL1	VESARAAYDSGNSAIENKIKECRSY PLYKFVREELGTGLLTGEKVRSPGEEFDKVFTAMC	691
	* * * : * : * * : * : * : * : * : * * : * * * : * * * : * * : *	

附图 1. クローニングした *EsPAL* から予想されるアミノ酸配列アライメント (つづき)

Fig. S1. Continued

At: *A. thaliana*, Egr: *E. grandis*, Er: *E. robusta*, Nta: *N. tabacum*, Ptr: *P. trichocarpa*, Es4: *E. saligna* (20483), Es6: *E. saligna* (20675), Es8: *E. saligna* (20835)

AtPAL1	EGKIIDPMMECLNEWNGAPIPIC-----	725
AtPAL2	EGKLIDPLMDCCLKEWNGAPIPIC-----	717
EgrPAL1	EHKIIDSMFECLSSWNGVPTPIR-----	708
EgrPAL2	EGKLGDVLMQCFKNCSS-----	703
EgrPAL3	EGKLIDPLLECLRWDGAPLPIC-----	714
EgrPAL4	EGKLIDPLLECLRWDGAPLPIC-----	714
EgrPAL5	EGKLIDPLLECLRWDGAPLPIC-----	714
EgrPAL6	EGKLIDPLLECLKWDGAPLPIC-----	714
EgrPAL7	EGKLIDPLLECLRWDGAPLPIC-----	714
EgrPAL8	EGKLIDPLLECLKWDGTPLPIC-----	723
EgrPAL9	AGKLIDPLLECLSGWNGAPLPIS-----	715
ErPAL1	AGKLIDPLLECLSGWNGAPLPIS-----	715
Es4cPAL4-13	EGKLIDPLLECLKWDGTPLPIC-----	717
Es4cPAL4-15	EGKLIDPLLECLKWDGTPLPIC-----	722
Es4cPAL4-19	EGKLIDPLLECLKWDGTPLPIC-----	722
Es4cPAL4-20	EGKLIDPLLECLKWDGTPLPIC-----	723
Es4dPAL3	EHKIIDSMFECLSSWNGVPTPIR-----	708
Es4dPAL4-1	EGKLIDPLLECLKWDGTPLPIC-----	722
Es4dPAL4-2	EGKLIDPLLECLKWDGTPLPIC-----	723
Es4dPAL5-14	EGKLGDVLMQCFKNCSS-----	704
Es4dPAL5-15	EGKLGDVLMQCFKNCSS-----	703
Es4dPAL5-64	EGKLGDVLMQCFKNCSS-----	703
Es4dPAL5-65	EGKLGDVLMQCFKNCSS-----	704
Es4dPAL5-67	EGKLGDVLMQCFKNCSS-----	703
Es6cPAL1	AGKLIDPLLECLSGWNGAPLPIS-----	715
Es6cPAL4-2	EGKLIDPLLECLKWDGTPLPIC-----	723
Es6cPAL5-14	EGKLGDVLMQCFKNCSS-----	703
Es6cPAL5-17	EGKLGDVLMQCFKNCSS-----	703
Es6cPAL5-2	EGKLGDVLMQCFKNCSS-----	703
Es6cPAL5-22	EGKLGDVLMQCFKNCSS-----	703
Es6cPAL5-26	EGKLGDVLMQCFKNCSS-----	703
Es6cPAL5-8	EGKLGDVLMQCFKNCSS-----	703
Es6dPAL3	EHKIIDSMFECLSSWNGVPTPIR-----	708
Es6dPAL4-10	EGKLIDPLLECLKWDGTPLPIC-----	721
Es6dPAL4-3	EGKLIDPLLECLKWDGTPLPIC-----	723
Es6dPAL5	EGKLGDVLMQCFKNCSS-----	703
Es8cPAL4-16	EGKLIDPLLECLKWDGTPLPIC-----	723
Es8dPAL3	EHKIIDSMFECLSSWNGVPTPIR-----	708
Es8dPAL4-10	EGKLIDPLLECLKWDGTPLPIC-----	723
Es8dPAL4-11	EGKLIDPLLECLKWDGTPLPIW-----	722
Es8dPAL4-37	EGKLIDPLLECLKWDGTPLPIC-----	722
Es8dPAL4-45	EGKLIDPLLECLKWDGTPLPIC-----	723
Es8dPAL5	EGKLGDVLMQCFKNCSS-----	703
NtaPAL1	NGQIIDPMLECLKSWNGAPLPIC-----	715
PtrPAL1	QGKIIDPMLECLGEWNGAPLPIC-----	714
	:: * :::*: ..	

附图 1. クローニングした *EsPAL* から予想されるアミノ酸配列アライメント (つづき)

Fig. S1. Continued

At: *A. thaliana*, *Egr*: *E. grandis*, *Er*: *E. robusta*, *Nta*: *N. tabacum*, *Ptr*: *P. trichocarpa*, *Es4*: *E. saligna* (20483), *Es6*: *E. saligna* (20675), *Es8*: *E. saligna* (20835)