特集記事

植物におけるプロテオーム解析と育種

平野 久

(横浜市立大学木原生物学研究所 / 大学院総合理科学研究科, 横浜市戸塚区舞岡町 641-12, 〒244-0813)

Proteome Analysis and Breeding in Plants

Hisashi Hirano

(Yokohama City University, Kihara Institute for Biological Research/Graduate School of Integrated Science, Maioka 641-12, Totsuka, Yokohama 244-0813, Japan)

キーワード：植物, タンパク質, プロテオーム, ゲノム, ポストゲノム研究, 育種

1 プロテオームとはなにか

機能的に調和のとれた生活を営むのに必要な最小限の遺伝子(染色体)ひとそろいを「ゲノム」と呼んでいるが、1995年にM. R. Wilkinsは、このゲノムの遺伝子が産生する多種類のタンパク質ひとそろいを「プロテオーム」と呼ぶことを提唱した(Wasinger 1995)。

ゲノム解析の進展により、1990年代半ばから多くの生物でゲノムの全塩基配列が決定され、遺伝子構造や遺伝子発現に関する理解が深まった。しかし、同時にゲノム解析で決定された塩基配列から、データベースを利用した相同タンパク質の検索によって機能が推定できるタンパク質の割合は全翻訳産物の30~50%程度に過ぎないこともわかってきた。そのためこれからはポストゲノム研究としてタンパク質の特性を分析し、タンパク質と遺伝子の対応を明らかにした後、ゲノム情報を利用しながらすべてのタンパク質、すなわちプロテオームの機能を解明する研究を進める必要があると考えられるようになった。これに伴い「プロテオミクス」(プロテオーム科学)と呼ばれるプロテオームに係わる新しい学問領域も生まれた。

プロテオーム研究は、最近発達の著しい質量分析装置などを駆使して、ゲノム解析に相当するようなハイスループットな(処理能力の高い)分析によって多数のタンパク質の機能を明らかにすることを目標としている。この点で従来のタンパク質研究と大きく異なっている。

2 トランスクリプトームとプロテオーム

プロテオームに倣い、全転写産物、すなわちmRNAの総体をトランスクリプトームと呼ぶようになった。ト

ランスクリプトームを解析すれば、それぞれの転写産物の発現量をハイスループットで明らかにすることができる。しかし、この解析によって実際に機能しているタンパク質の実体を掴むのはむずかしい。タンパク質は、種類により、また、存在する条件によって寿命が異なる。寿命の長いタンパク質は多量に存在する必要があるとしても多量に翻訳される必要はない。そのため転写産物量と翻訳産物の存在量との間の相関はかなり低い(Anderson and Seilhamer 1997)。従って、機能しているタンパク質の存在量を転写産物量から正確に推定することはできない。一方、転写産物の分析からではタンパク質の翻訳中、翻訳後の修飾や立体構造、タンパク質相互作用などに関する情報を得ることもできない。すべてのタンパク質は翻訳中あるいは翻訳後に様々な修飾を受け、特有の立体構造をとって成熟タンパク質になる。そして、相互に作用してはじめて機能を発揮する。従って、タンパク質の機能を明らかにしようとする場合には、必ず機能しているタンパク質そのものを分析し、翻訳中、翻訳後の修飾や立体構造、相互作用などに関する情報を集めることが必要である。それもこれからはゲノム解析に対応するような大規模でハイスループットなタンパク質の解析が必要になってくる。

3 育種におけるプロテオーム解析の役割

プロテオーム解析によってゲノムDNAとそれらがコードする多くのタンパク質の対応が明らかになり、遺伝子とその翻訳産物の機能を効率的に解析できるようになる意義は大きい。この解析によって植物の増殖分化、成長などに係わる新規なタンパク質が多数発見されると期待される。すでに述べたようにこれまでに機能が明らかにされているタンパク質は30~50%であるから、現在、タンパク質の多くは、機能が明らかにされていないことになる。これらの中には、予測しなかったような機能を持ったタンパク質も少なくないと考えられる。プロテオーム解析によって、こうしたタンパク質の機能発現様式について理解を深めることができれば、タンパク質

の機能発現を遺伝的に改良することによって生産性の高い品種を育成できる可能性がある。また、プロテオーム解析では、罹病や農薬、環境などのストレスによるタンパク質の発現の変化を捉えることができるので、病気やストレスに耐性を持った品種を育成する道が開かれる可能性がある。

4 プロテオーム解析の方法

プロテオーム解析は、多種類のタンパク質を分離精製することから始まる。タンパク質の分離精製には簡便迅速で分離能が高い二次元電気泳動(2-DE)が用いられることが多い。2-DEで分離されたタンパク質それぞれについて質量分析によりペプチドマップ(ペプチドマスフィンガープリントと呼ばれる)を作製したり、質量分析装置(MS)や気相シーケンサーにより部分アミノ酸配列を決定する。そして、これらのデータを基にゲノム解析で作製されたデータベースを検索し、タンパク質と遺伝子の対応関係を明らかにする。

遺伝子の塩基配列からタンパク質の完全なアミノ酸配列が推定できるので、これを用いてタンパク質配列データベースを検索すれば、すでに機能が明らかにされているタンパク質であるかどうかがわかる。また、既知の機能をもったタンパク質と配列に類似性がある場合にはタンパク質の機能を推定することができる。

相同性検索によってタンパク質機能がわからない場合にはタンパク質の各種特性を分析し、タンパク質機能の解明を目指すことになる。タンパク質の機能を明らかにするためには、タンパク質の翻訳後の修飾、立体構造、発現量、発現時期、局在性、タンパク質相互作用、会合、酵素活性、生理活性などを分析する必要がある。プロテオーム解析ではこれらの分析の結果とゲノム解析における遺伝子分析の結果に基づいてタンパク質の機能を明らかにしていく。それも1, 2種類のタンパク質の機能の解明を目指すのではなく、ハイスループットな分析によって、多数の、できればすべてのタンパク質の機能を解明することを目標としている。

プロテオーム解析によって得られる2-DEパターンやそれぞれのタンパク質の配列や構造に関する情報、2-DEで分離されたタンパク質をコードする遺伝子の情報、タンパク質の機能に関する情報については、データベース化し、多くの研究者が利用できるようにすることが重要である。

5 植物プロテオーム解析の現状

1) プロテオームの動態解析

同じ植物種の同一個体であっても生育段階や組織器官により発現するタンパク質の種類は異なってくる。さらに、環境によっても発現は異なる。プロテオームは極め

て動的である。これはゲノムDNAの存在が同じ個体であれば変動しない静的なものであるのとは対照的である。

2-DEを用いてタンパク質の動態を解析する研究は、ゲノム解析が始まる前から盛んに行われてきた(Thiellement *et al.* 1999)。特定の環境下で生育する植物の特定の生育段階の組織器官のタンパク質が2-DEで分離され、そのパターンの種間、品種間、系統間差異が解析されている。また、生育段階や組織器官に特異的に出現あるいは消失したり(Masson and Rossignol 1995)、ホルモン処理により変動するタンパク質も2-DEで分析された(Santoni *et al.* 1997)。一方、半矮性のような表現型をもつ準同質遺伝子系統(Hirano *et al.* 1991)や突然変異体(Damerval and Le Guilloux 1998)に出現あるいは消失するタンパク質が検出されている(Santoni *et al.* 1997)。こうしたタンパク質の解析は、植物の成長や分化を制御するタンパク質を同定する上で重要である。

植物においても病気やストレスで出現あるいは消失するタンパク質を2-DEで解析した報告は多い(Ramani and Apte 1997, Rey *et al.* 1998, Riccardi *et al.* 1998)。この種のタンパク質の解析は、耐病性や耐塩性などのストレス耐性機構においてどのようなタンパク質が関わっているかを解明するために欠かせない。また、植物がもつアレルゲンタンパク質(Weiss *et al.* 1997)、ビールの麦芽品質関連タンパク質(Görg *et al.* 1992)、製パン性関連タンパク質(Lafiandra and Kasarda 1985)などが2-DEで同定されているが、これらは植物タンパク質の食品としての機能を明らかにする上で重要性が高い。タンパク質の動態に関するこれまでの研究の大半はポストゲノム研究であるプロテオーム研究として進められてきたものではないが、タンパク質の機能の解明につながる研究であると考えられるのでプロテオーム研究の一環と捉えるべきであろう。

最近、Gygi *et al.* (1999)やOda *et al.* (1999)によってMSを用いて異なる状態の細胞のタンパク質量の違いを定量的に測定する方法が報告された。いずれの方法も異なる状態の細胞のタンパク質を安定同位体で標識し、MSによる分析で得られるペプチドマスフィンガープリントを比較することによってタンパク質含量の違いを解明しようとするものである。これらの方法は、タンパク質の絶対量を正確にとらえることはむずかしいが、異なる状態にある組織細胞のタンパク質含量の相対的な違いを、それがわずかな違いであっても、検出できる。どちらの方法でも同じタンパク質であれば同位体標識後も物理化学的な性質にほとんど差がないので、イオン化の効率に差異は出ない。従って、MSで精度の高い定量的な分析を行うことができる。このような手法を用いて植物でもタンパク質の動態を解析する研究が行われようとしている。

図1. MALDI-TOF MSによるイネ種子胚芽タンパク質の同定(福田・禹・山岸・清水・高岡・平野, 未発表)
イネ(品種 日本晴)種子胚芽タンパク質を2-DEで分離した(図1A). 2-DEパターンは, PDQuest 画像解析ソフトウェア(日本バイオラッドラボラトリーズ社)を用いて解析し, スポットの位置を確定した(図1B)後, 各スポットの等電点, 分子量, 濃度を推定した. 2-DEゲルからタンパク質スポット(9z)を切り取り, トリプシンでタンパク質のゲル内消化を行った(福田ら2000). この処理によりタンパク質はリシンとアルギニンのC末端で特異的に切断される. 得られたペプチド混合物をMALDI-TOF MSの試料ターゲットに添加し, 質量分析を行い, ペプチドマスフィンガープリントを作成した(図1C-1). これと同じペプチドマスフィンガープリント組成を持つタンパク質をデータベースで検索した結果, このスポットはF1-ATP合成酵素のスポットであることがわかった(図1C-2).

2) タンパク質・遺伝子の同定

1987年に電気泳動で分離されたタンパク質をPVDF膜のような膜フィルターにブロットし、気相シーケンサーで部分アミノ酸配列を分析する方法が開発された(Matsudaira 1987)が、この方法を応用して1980年代後半から植物に関しても2-DEで分離された多数のタンパク質の部分アミノ酸配列が分析され、タンパク質を同定する研究が行われた(Hirano 1989)。その後、イネ(Hirano 1997, Komatsu *et al.* 1994, Tsugita *et al.* 1994, Zhong *et al.* 1997), トウモロコシ(Riccardi *et al.* 1998), コムギ(Gomez *et al.* 1991), オオムギ(Flengsrud 1993), シロイヌナズナ(Kamo *et al.* 1995, Santoni *et al.* 1998), タバコ(Rouquie *et al.* 1997)など多くの植物で類似の研究が行われた(梶原2000)。

最近、マトリックスアシステッドレーザーデソープシオンイオン化飛行時間型質量分析装置(MALDI-TOF MS)のようなMSが発達し、2-DEで分離されたタンパク質をゲル中でトリプシンのようなプロテアーゼにより消化して生じるペプチドをMSによって高感度、高精度かつハイスループットで分析できるようになった。この際得られる質量スペクトル(ペプチドマスフィンガープリント)をデータベース中のタンパク質の理論的なペプチドマスフィンガープリントと比較することによりタンパク質の同定(図1)が植物でも行われている。一方、MALDI-TOF MSとポストソースディケイ法(イオン源でイオン化された後、イオン自体の内部エネルギーによりタンパク質あるいはペプチドの断片化が起こる。この断片を分離検出する方法)を組み合わせたMSやエレクトロスプレーイオン化四重極TOF MSのようなMS/MSを用いることにより、ごく微量のペプチドのアミノ酸配列が決定できるようになった。しかし、植物に関しては、MSを用いて2-DEで分離したタンパク質の部分配列をハイスループットで決定し、タンパク質を同定したという報告はない。

プロテオーム解析では、2-DEで分離されたタンパク質とゲノム解析で単離された遺伝子との対応関係を明らかにする必要がある。プロテオーム解析はゲノム解析の成果を最大限活用するために行われるものであるから、タンパク質と遺伝子の対応を明らかにすることは極めて重要である。遺伝子の同定には、通常、MSにより得られたペプチドマスフィンガープリントやMSや気相シーケンサーにより決定された部分アミノ酸配列が用いられる。

イネでは、1996年時点でゲノムプロジェクトにおいて約2万のExpressed Sequence Tag(EST)の塩基配列が決定された。これらのESTの重複度は約50%であると推定されている。イネには2~4万の遺伝子が存在するとみられるので、クローニングされたESTは全遺伝子の25~50%と推定される。2-DEで分離された1800以上の胚芽、胚乳、葉および根のタンパク質のうち、126のア

ミノ酸配列が気相シーケンサーにより決定され、アミノ酸配列に基づいて約30%のタンパク質をコードするESTが検索された(Hirano 1997)。ESTと対応がついたタンパク質の比率は約30%で、上記のクローニングされたESTの比率(25~50%)の範囲に入っていた。最近では、ESTが3万を越えたが、アミノ酸配列からタンパク質を検索したところ、60%以上のタンパク質をコードするDNAを同定できることがわかった。これは理論的な値と概ね一致する。1999年からは、著者の研究室でMALDI-TOF MSを用いたペプチドマスフィンガープリンティングによりイネのタンパク質や遺伝子をハイスループットで同定する研究が始まった。

シロイヌナズナでは、葉の原形質膜画分に含まれる700のタンパク質が2-DEによって分離された(Santoni *et al.* 1998)。このうち、約550が原形質膜に存在するものであると推定された。ゲル中のタンパク質のトリプシン分解で得られたペプチドが高速液体クロマトグラフィーで精製され、エドマン分解によりアミノ酸配列が分析された。その結果、82スポットの部分アミノ酸配列が明らかになった。このうち機能が明らかなタンパク質は約65%であった。また、機能はわからないがESTが同定できたものは約20%あった(Santoni *et al.* 1998)。この場合は、ゲノム解析で得られた3万6千のESTからタンパク質に対応するESTの同定が行われた。

上記イネおよびシロイヌナズナの研究によって、2-DEで分離されたタンパク質の部分アミノ酸配列情報を利用してゲノム解析で得られたDNAライブラリーの遺伝子とタンパク質の対応を明らかにできることが確かめられた。今後、ESTライブラリーが拡充されたり、ゲノムの完全な配列が決定されると予測されるが、その段階ではタンパク質と遺伝子を100%対応づけることができると考えられる。

3) プロテオームの機能解析

機能が明らかにされていないタンパク質の機能を、翻訳中や翻訳後の修飾、タンパク質の相互作用、立体構造などをハイスループットで解析することにより明らかにしていくことがプロテオーム解析の重要な目的である。次に示す実験例は、2-DEで分離された植物タンパク質の機能を著者らがプロテオーム解析の方法を用いて分析した例である。

ダイズの種子で発現するタンパク質を2-DEで分析した。その結果、27 kDの α サブユニットと16 kDの β サブユニットからなる塩基性タンパク質(LBP)が検出された(平野 1998)。研究開始の時点で、このタンパク質の構造と機能は知られていなかった。LBPは、ダイズの他、リョクトウ、インゲンマメ、アズキなどのマメ科植物やニンジンなどでも見いだされた。LBPの構造的特徴を調べたところ、LBPには動物のインスリン受容体と構造上の類似性があることがわかった。また、LBPは、プロテ

インキナーゼ活性をもち、インスリン受容体と同じように原形質膜(一部細胞壁)に局在することが明らかになった。そこでLBPをリガンドとしてアフィニティークロマトグラフィーによりLBPに結合する活性をもつタンパク質を精製したところ、分子量3,900のペプチドを単離することができた。レグインスリンと命名したこのペプチドは37残基からなり、インスリンとアミノ酸配列に相同性はないが、インスリン同様、6残基のシステインをもち、これらのすべてがジスルフィド結合に係わっていた。レグインスリンは細胞壁近傍に局在しており、LBPに結合するとそのプロテインキナーゼ活性を亢進した。この際、レグインスリンのジスルフィド結合を切断するとその効果は見られなくなった。核磁気共鳴スペクトルにより解析したレグインスリンの三次構造にはインスリンの構造と一部類似した点があった。また、レグインスリンをニンジンカルス培養培地に添加すると、植物体分化能や胚形成能に影響が現われた。さらに、ニンジン培養細胞の分裂の促進効果が認められた。また、レグインスリン遺伝子を導入した形質転換体ではカルスの初期生育にレグインスリンの効果が見られた。これらの結果から、レグインスリンにはレグインスリン受容体と考えられるLBPのリン酸化を介して成長や分化、細胞分裂の制御に係わっていると推察された。動物では、すでに多くのペプチドホルモンの存在が知られている。これらの中には、受容体に結合し、そのプロテインキナーゼ活性を亢進することによりホルモン情報の伝達を行い、動物の成長や分化を制御しているものがある。しかし、植物では、これまでこのようなホルモンやその情報伝達系の存在は明らかでなかった。

上記の研究例では、2-DEで分離されたタンパク質をプロテオーム解析の手法を使って分析することにより、ホルモンと類似した機能をもつペプチドとそれによる情報伝達系の存在を示唆することができた。プロテオーム解析ではこの種の研究を多数のタンパク質を対象にしてハイスループットで行う必要がある。しかし、植物ではまだタンパク質の機能を網羅的にハイスループットで解析する研究は行われていないのが実状である。

4) プロテオームのスマールワールド、複合体

細胞内のすべてのタンパク質について機能を解明することは現時点では容易なことではないが、タンパク質複合体中のタンパク質の機能を解明することは細胞内のすべてのタンパク質の機能を解明することほど困難ではない。機能的に何らかの関係をもつ複合体中のタンパク質を次々と調べていけば、ゲノムによりコードされた多くのタンパク質の機能をより効率的に解析できる可能性がある。このような観点から、著者らは、31種類のサブユニットからなる巨大タンパク質複合体であるプロテアソームに的を絞り、プロテアソームサブユニットのすべての翻訳中および翻訳後の修飾と機能の関係を解明を目指す研究に始めた。これまでにすべてのサブユニットのN末端アセチル化やリン酸化といった翻訳後の修飾を網羅的に解析し、それらの修飾と機能との関係を示唆する結果を得た(Ito *et al.* 2000, 岩船ら 2000, Kimura *et al.* 2000, Sassa *et al.* 2000)。今後、プロテオーム解析によって得られる情報を基に、すべてのサブユニットの機能をより明確なものにすることができると考えられる。

5) 植物プロテオームのデータベース化

いくつかの植物では、プロテオーム解析によって得られる2-DEパターンや分離されたタンパク質の配列や構造、各タンパク質をコードする遺伝子、タンパク質の機能などに関する情報がデータベース化されている。シロイヌナズナ(<http://sphinx.rug.ac.be:8080/ppmdb/index.html>)やトウモロコシ(<http://moulon.inra.fr/imgd>)データベースが比較的充実している。例えば、シロイヌナズナのデータベースにアクセスすると、まず2-DEパターンを見ることができる。ゲル上のスポットをクリックすると、タンパク質の等電点、分子量、MSデータ、アミノ酸配列、疎水性、細胞内局在性、動態、他のデータベースとのリンク、発表論文などに関する情報を入手することができる。また、分析に用いられた方法も詳しく記載されている。このようなデータベースを今後充実させていくことが重要である。なお、プロテオームデータベースは、DNAやタンパク質配列データベースと異なり、新しいデータを外部から登録できるシステムがない。この点は

表1. プロテオーム解析に用いられる主な分析機器

タンパク質の分離精製	二次元電気泳動装置, プロッティング装置, 蛍光イメージアナライザー
二次元電気泳動画像解析・データベース化	画像解析装置, ソフトウェア
タンパク質・遺伝子の同定	質量分析装置(MALDI-TOF MSおよびESI Q-TOF MS), 気相シークエンサー
タンパク質の翻訳後修飾の解析	質量分析装置(ESI Q-TOF MS)
タンパク質の立体構造解析	核磁気共鳴装置, X線解析装置
タンパク質相互作用の解析	表面プラズモン共鳴測定装置, 質量分析装置(MALDI-TOF MSおよびESI Q-TOF MS), プロテインチップ
タンパク質の動態解析	二次元電気泳動装置, 質量分析装置(MALDI-TOF MSおよびESI Q-TOF MS)

大きな課題になっている。

6 植物プロテオーム解析の課題

すでに述べたように、プロテオーム解析ではあらゆる組織であらゆる時期に発現するタンパク質の解析が必要であるから、プロテオーム研究はゲノムプロジェクトよりはるかに時間と労力のかかる研究になると推測される。この研究を迅速に推進するためには、大規模なプロテオーム解析を進めるための研究組織の構築が大きな課題になるように思われる。小さなゲノムサイズの生物のプロテオーム解析は数人の研究グループでも対応できるかも知れない。しかし、ゲノムサイズの比較的大きい植物のプロテオーム解析を行おうとする場合には、大きな研究組織を構築することが重要である。

一方、プロテオーム解析では、2-DE、2-DE 画像解析装置、MS、核磁気共鳴装置、X線解析装置、プラズモン共鳴測定装置など多種類の分析装置を用いる必要がある(表1)。しかし、現在の装置は、大規模なプロテオーム解析に必ずしも十分なものではない。なお一層の高感度化・高精度化、そして分析の迅速化・自動化が望まれている。また、得られた情報のデータベース化とその利用技術の開発もまた不可欠である。

引用文献

- Anderson, L. and J. Seilhamer (1997) *Electrophoresis* 18: 533–537.
- Damerval, C. and M. Le Guilloux (1998) *Mol. Gen. Genet.* 257: 354–361.
- Flengsrud R. (1993) *Electrophoresis* 14: 1060–1066.
- 福田正史・岩船裕子・川崎博史・平野 久(2000) *育種学研究* 2 (別1): 89.
- Gomez, L., R. Sanchez-Monge, C. Lopez-Otin and G. Salcedo (1991) *J. Cereal Sci.* 14: 117–123.
- Görg, A., W. Postel, M. Baumer and W. Weiss (1992) *Electrophoresis* 13: 192–203.
- Gygi, S. P., B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb and R. Aebersold (1999) *Nature Biotech.* 17: 994–999.
- Hirano, H. (1989) *J. Protein Chem.* 8: 115–130.
- Hirano, H. (1997) *J. Protein Chem.* 16: 533–536.
- 平野 久(1998) *蛋白質核酸酵素*, 43: 27–39.
- Hirano, H., S. Komatsu, A. Nakamura, F. Kikuchi, H. Kajiware, S. Tsunasawa and F. Sakiyama (1991) *Theor. Appl. Genet.* 83: 153–158.
- Ito, K., Y. Kimura, H. Sassa and H. Hirano (2000) *Jpn. J. Electrophoresis*, 44: 205–210.
- 岩船裕子・鍵 紀子・川崎博史・平野 久(2000) *生化学*, 72: 771.
- 梶原英之(2000) *植物のプロテオーム解析*. 実験医学別冊プロテオーム解析法, 磯辺俊明・高橋信弘編, 237–240, 羊土社, 東京.
- Kamo, M., T. Kawakami, M. Miyatake and A. Tsugita (1995) *Electrophoresis* 16: 423–430.
- Kimura, Y., M. Takaoka, S. Tanaka, H. Sassa, K. Tanaka, B. Polevoda, F. Sherman and H. Hirano (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 4635–4639.
- Komatsu S., H. Kajiware and H. Hirano (1994) *Theor. Appl. Genet.* 86: 935–942.
- Lafiandra, D. and D. D. Kasarda (1985) *Cereal Chem.* 62: 314–319.
- Masson, F. and M. Rossignol (1995) *Plant J.* 8: 77–85.
- Matsudaira P. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 10035–10038.
- Oda, Y., K. Huang, F. R. Cross, D. Cowburn and B. T. Chait (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 6591–6596.
- Ramani, S. and S. K. Apte (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233: 663–667.
- Rey, P., G. Pruvot, N. Becuwe, F. Eymery, D. Rumeau and G. Peltier (1998) *Plant J.* 13: 97–107.
- Riccardi, F., P. Gazeau, D. de Vienne and M. Zivy (1998) *Plant Physiol.* 117: 1253–1263.
- Rouquié, D., J.-B. Peltier, M. Marquis-Mansion, C. Tounaire, P. Doumas and M. Rossignol (1997) *Electrophoresis* 18: 654–660.
- Santoni, V., D. Rouquié, P. Doumas, M. Mansion, M. Boutry, H. Degand, P. Dupree, L. Packman, J. Sherrier, T. Prime, G. Bauw, E. Posada, P. Rouzé, P. Dehais, I. Sahnoun, I. Barlier and M. Rossignol (1998) *Plant J.* 16: 633–641.
- Santoni, V., M. Delarue, M. Caboche and C. Bellini (1997) *Planta* 202: 62–69.
- Sassa, H., S. Oguchi, T. Inoue and H. Hirano (2000) *Gene* 250: 61–66.
- Thiellement, H., N. Bahrman, C. Damerval, C. Plomion, M. Rossignol, V. Santoni, D. de Vienne and M. Zivy (1999) *Electrophoresis* 20: 2013–2026.
- Tsugita, A., T. Kawakami, Y. Uchiyama, M. Kamo, N. Miyatake and Y. Nozu (1994) *Electrophoresis* 15: 708–720.
- Weiss, W., G. Huber, K.-H. Engel, A. Pethran, M. Dunn, A. A. Gooley and A. Görg (1997) *Electrophoresis* 18: 826–833.
- Wasinger, V. C., S. J. Cordwell, A. Cerpa-Poljak, J. X. Yan, A. A. Gooley, M. R. Wilkins, M. W. Duncan, R. Harris, K. L. Williams and I. Humphrey-Smith (1995) *Electrophoresis* 16: 1090–1094.
- Zhong, B.-X., S. Komatsu, H. Karibe, H. Ichimura, Y. Nagamura, T. Sasaki and H. Hirano (1997) *Breed. Sci.* 47: 245–251.