

魚類普通肉水可溶性画分におけるパルブアルブミン 結合カルシウムの分布とアイソフォーム

讃岐 斉,^{1a} 秦 正弘,^{2*} 竹内昌昭¹

(2002年4月9日受付 2002年10月9日受理)

¹東北大学大学院農学研究科生物資源化学講座

²東北大学大学院農学研究科生物環境機能学分野

Distribution of calcium bound to parvalbumin in
water-soluble fractions in some fish muscles

HITOSHI SANUKI,^{1a} MASAHIRO HATA^{2*} AND MASAOKI TAKEUCHI¹

¹Laboratory of Marine Biochemistry, ²Laboratory of Environmental Biochemistry, Graduate School of Agriculture, Tohoku University, Tsutsumidori-Amamiya, Aoba, Sendai, Miyagi 981-8555, Japan

The distribution of calcium bound to parvalbumin (PA) in water-soluble fraction of ordinary muscles from four species was studied. About 65% of the calcium existed in the PA fraction with carp and pacific cod, however, only about 10% of the calcium existed in the PA fraction with pacific saury and rainbow trout. Molecular masses of these PAs were 10-12.5 kDa. Three and two PA isoforms were detected with carp, pacific cod and rainbow trout, and with pacific saury, respectively. The mobility and relative ratio of PA isoforms were very different among fish species.

キーワード：カルシウム，普通肉，水可溶性画分，ゲルろ過，カルシウム結合タンパク質，パルブアルブミン，アイソフォーム

魚類普通肉におけるカルシウムの分布は種間で差が認められ，主に水可溶性画分中に存在している。¹⁾ 水可溶性画分に存在するカルシウムの多くは，抽出液の状態では，現在知られている水溶性カルシウム結合タンパク質^{2,3)}や，その他の物質と結合しているかあるいは遊離の状態で存在していると推測される。水可溶性画分のカルシウム分布については，水生無脊椎動物のザリガニ⁴⁾やゴカイ⁵⁾では調べられているが，魚類での報告はない。カルシウムイオンは，筋肉の収縮⁶⁾や物質代謝および情報伝達⁷⁾など多くの生命現象に関与しており，水可溶性画分におけるカルシウムの分布を調べることは，筋肉細胞内でのカルシウムの動態・機能を考える上で重要である。

筋肉水可溶性画分に存在するカルシウム結合タンパク質としてパルブアルブミン (PA) が知られている。PA の分子量は 10-12 kDa で，酸性のタンパク質である。⁸⁾

タンパク質 1 mol 当たり 2 mol のカルシウム結合能をもち，両生類や魚類の白色筋において高含量存在する。⁹⁾ 魚類普通肉における PA については，アイソフォームの種類，¹⁰⁾ 含量と体長との関係，¹¹⁾ 成長との関係¹²⁾などが調べられている。またアレルゲンとしての作用もある。¹³⁾ 筋肉における PA の機能としては，筋収縮において，弛緩の際の Ca⁺ 輸送を速め弛緩を促進すると考えられているが，^{14,15)} 不明な点も多い。

そこで，本研究では数種の魚類について，普通肉より抽出した水可溶性画分をゲルろ過により分画し，PA に結合しているカルシウムの分布を調べた。また，普通肉 PA を比較検討するための基礎データを得るために，部分精製を試み，その分子量，紫外部吸収スペクトル，アイソフォームの数や種類，含量などを調べた。

* Tel : 81-22-717-8835. Fax : 81-22-717-8835. Email : mhata@bios.tohoku.ac.jp

^a 現所属：鹿児島県立国分高等学校 (Kokubu High School, Kokubu, Kagoshima 899-4332, Japan)

試料および方法

試料魚類 塩釜港, 石巻港で購入したマダラ, サンマおよび養殖されたコイ, ニジマスを試料とした。試料は, 氷あるいはドライアイスを用い, 冷却しながら実験室へ搬入した。直ちに使用しない試料は, -80°C で凍結保存した。

試料の調製 水可溶性画分の調製は以下のようにおこなった。小骨を除いた普通肉 5~12 g に, 4 倍量の 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) を加え, ポリトロン型ホモジナイザーで 60 秒間ホモジナイズした後, 遠心分離 ($40,000 \times g$, 20 分, 4°C) した。上清を水可溶性画分とした。以下の処理はことわりのない限り, 約 4°C でおこなった。

SDS-PAGE の試料としては, 水可溶性画分を 60°C で 10 分間, 温浴中で熱処理した後, 30 分間放冷し遠心分離 ($40,000 \times g$, 20 分) し, 得られた上清を粗 PA として用いた。HPLC 用の試料は, 粗 PA の抽出法に従い調製した。¹⁶⁾ すなわち, 普通肉 5 g に 10 mL の 4 mM EDTA 溶液 (pH 7.5) を加え, ポリトロン型ホモジナイザーでホモジナイズ後, 遠心分離 ($40,000 \times g$, 20 分) し, 得られた沈殿に 4 mM EDTA 溶液 (pH 7.5) を 5 mL 加え, ホモジナイズしそれを遠心分離した。2 回の遠心分離で得た上清を合わせ, それを 60°C で 10 分間, 温浴中で熱処理した。これらを放冷した後遠心分離し, 上清を粗 PA として HPLC 分析に供した。

コイ PA の調製 コイの PA をスタンダードとして使用するため, 抽出した水可溶性画分をさらに冷アセトンを用いて部分精製した。¹⁷⁾ 水可溶性画分に, 終濃度が 45% (v/v) になるように攪拌しながら冷アセトンを徐々に滴下して加え, 30 分間静置した後遠心分離 ($40,000 \times g$, 20 分, 4°C) した。沈殿を少量の 20 mM リン酸緩衝液, あるいは 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.7) に溶解し, 0~45% (v/v) アセトン画分とした。上清に, さらに冷アセトンを終濃度 55% (v/v) まで加えた後, 遠心分離 ($40,000 \times g$, 20 分, 4°C) した。沈殿を上記緩衝液に溶解し, 45~55% (v/v) アセトン画分とした。さらに, 得られた上清から同様に 55~80% (v/v) アセトン画分を得, これを粗 PA 画分とした。この画分は, さらにゲルろ過により精製し, PAGE により PA 以外の成分は含まれないことを確認した後, アイソフォームや PA 含量の測定用スタンダードとして使用した。

ゲルろ過 タンパク質からカルシウムが解離すること^{5,18)}が予想されたので, ゲルろ過は, 5×10^{-6} M 塩化カルシウムを含む 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.7) で平衡化した Bio-Gel P-60 カラム (2.7×55 cm) を用いておこなった。流量は 30 mL/h とし, 1 フラク

ションは 4 mL とした。各画分のタンパク質は 280 nm における吸収により, タンパク質およびカルシウムの濃度は前報¹⁾と同様に求めた。

吸収極大値の測定 ゲルろ過で分画した PA およびその他の画分の吸収極大波長は, 日立 150-20 形ダブルビーム分光光度計により測定した。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) Ornstein¹⁹⁾と Davis²⁰⁾の方法に従い, 2.5% の濃縮ゲル, 7.5% の分離ゲル濃度でおこなった。ゲルの厚さ 1 mm, 濃縮ゲル 5 mm, 分離ゲル 60 mm とした。泳動はマイクロスラブゲル電気泳動装置 (マリソル KS-810MSE 型) を用い, プロモフェノールブルーが分離ゲルに入るまでは 50 V, 分離ゲルに入った後は 100 V の定電圧で約 4 時間おこなった。タンパク質はコマジープリリアントブルー R-250 で染色した。カルシウム結合タンパク質はルテニウムレッドにより検出した。²¹⁾

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) Laemmli の方法²²⁾に従い, 4.5% の濃縮ゲル, 15% の分離ゲルで室温下で泳動をおこなった。ゲルのサイズ, 電圧などの条件は上述と同様である。

分子量の推定 タンパク質の分子量の推定は, SDS-PAGE によりおこなった。分子量推定用のマーカータンパク質として, ミオグロビン, MW マーカー (BDH) 2.5 kDa, 6.2 kDa, 8.2 kDa, 14.4 kDa, 16.9 kDa を用いた。また, チトクローム C, MW マーカー (オリエンタル酵母工業) モノマー (12.4 kDa), ダイマー (24.8 kDa), トリマー (37.2 kDa), テトラマー (49.6 kDa), ヘキサマー (73.8 kDa) も用いた。またカエルパルプアルブミン (12.1 kDa) (Sigma) を魚類との比較のため同時に泳動した。

PA の定量 PA の定量は HPLC を用いておこなった。^{16,23)} HPLC は, 日本分光のシステム (ポンプ 880PU, UV 検出器 100-6.) を用い, カラムはワイドポア C8 (YMC, AP-203, $\phi 4.6 \times 250$ mm) を用いた。溶離液として 0.1 mM 塩化カルシウムを含む 40 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5), およびアセトニトリルを用い, グラジエント法 (0~60% (V/V) アセトニトリル直線勾配) で 40 分間, 流速 1.0 mL/min で溶出した。タンパク質は 220 nm の吸光度より検出した。操作はすべて室温にておこなった。PA の含量はコイ, カエルおよび既報告の保持時間を参考にして, 20~28 分に溶出するピークを PA とし, コイ PA をスタンダードとして求めた。

結 果

コイ 水可溶性画分のゲルろ過の結果を Fig. 1-a に示した。水可溶性画分の 280 nm における吸収は, フラ

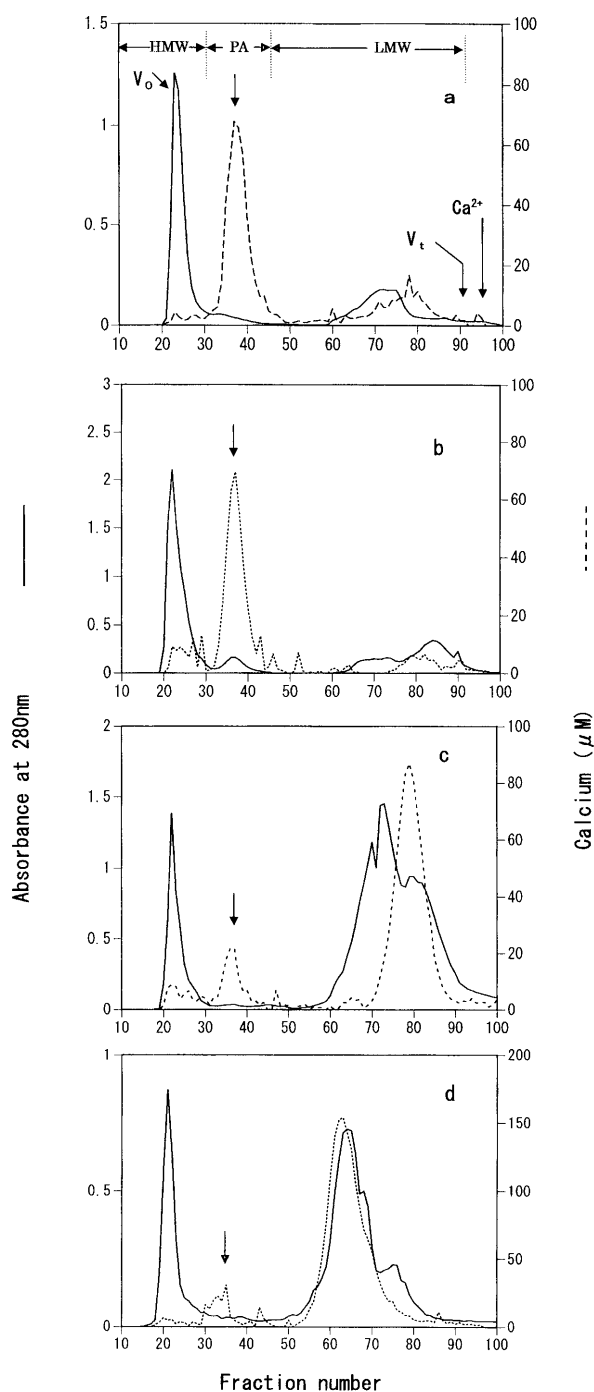


Fig. 1. Gel filtration chromatograms of the water-soluble fraction from some fish muscles on Bio-Gel P60. Column size: 2.7 (55 cm, buffer: 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.7) containing 5×10^{-6} M CaCl_2 , flow rate: 30 mL/h. V_0 and V_t are void and total volume, respectively. (a) carp, (b) Pacific cod, (c) Pacific saury, and (d) rainbow trout. Protein (—) and calcium (---) concentrations were estimated.

クシオン (以下 Fr と略記) 23 (void volume) および Fr.74 にピークが認められた。カルシウム濃度の分布は、Fr.37 に大きなピークが、Fr.77 および 80 に小さなピー

クが存在し、水可溶性カルシウムの大部分がタンパク質と結合していることが認められた。カルシウム濃度の高い Fr.37 のタンパク質は、ゲルろ過における標準タンパク質の分子量との比較から、分子量が約 1 万のタンパク質と推定され、カルシウム結合タンパク質の PA であることが示唆された。

コイ PA の確認 水可溶性画分中の PA を精製するためアセトン分画をおこなった。55–80% アセトン分画で得られた粗 PA を同条件でゲルろ過すると、Fr.37 に大きなタンパク質のピークが得られた。その他、void volume と Fr.74 に小さなピークが認められた。カルシウム濃度では Fr.37 に大きなカルシウムのピークが認められた。タンパク質のピークが認められた Fr.37 前後には、55–80% アセトン画分のカルシウムの 99% 以上が検出された。このフラクションのカルシウム含量は、タンパク質 1 モル当たり 2.1 モルであった。このモル比は PA のそれと¹⁷⁾一致する。また、Fr.37 の紫外吸収スペクトルは、252.8, 258.8 および 263.2 nm に吸収極大があり、258.8 nm が最も高かった。これは既報告のコイ PA の吸収スペクトル²⁴⁾とほぼ一致していた。

コイ普通肉より得られた粗 PA の SDS-PAGE および PAGE の泳動パターンを Fig. 2-3 および Fig. 3-1 に示した。55–80% (v/v) アセトン画分をゲルろ過し得られた画分の Fr.37 には PAGE で 3 本のバンド (成分Ⅳ, Ⅲ, Ⅱ) が認められ、これらは既報のコイ PA の成分Ⅳ, Ⅲ, Ⅱに相当すると考えられる。^{25,26)} これらのタンパク質はルテニウムレッドと反応が認められた (Fig. 3) ので、PA と判断された。また、⁴⁵Ca オートラジオグラフィ²⁷⁾や抗コイ PA 抗体による免疫染色^{27,28)}で反応が認められたことから PA であると確認された。²⁹⁾ SDS-PAGE により、主要な PA の分子量は 10.5 kDa と推定された (Fig. 2-3)。その他、10 kDa および 12.5 kDa にも PA が認められた (Fig. 2-3)。

粗 PA をゲルろ過して得られた PA 含有画分を HPLC 分析に供した。保持時間 22 分付近に 2 本のピークが認められ、これらのピークの面積と各フラクションのカルシウム含量の関係には強い相関が認められた。標品のカエル PA とは保持時間に若干の違いが認められたが、この違いは、既報告の PA の保持時間に相当する範囲内にある。^{16,23)}

以上のことから、その他の魚種においても、ゲルろ過で得られた分子量約 1 万のカルシウムのピークはカルシウム結合タンパク質である PA に結合したものであるとして検討を進めた。

遊離カルシウムは、 V_t (Fr.90, DNP アラニン) の直後に溶出したので (Fig. 1), ゲルろ過の Fr.1~31 を高分子画分, Fr.32~44 を PA 画分, Fr.45~90 を低分子画分, Fr.90 以降を遊離カルシウムを含む画分とした。

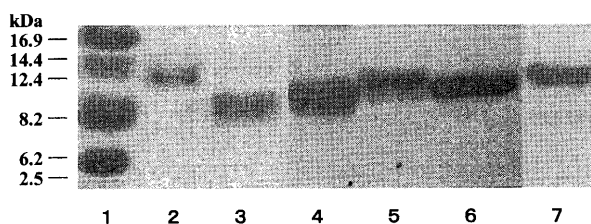


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoretogram of parvalbumins from some fish muscles. Proteins were stained with Coomassie brilliant blue R-250. PA was isolated by thermal treatment as described in method and material. (1) mw marker, (2) cytochrome C as mw marker (12.4 kDa), (3) carp, (4) pacific cod, (5) pacific saury, (6) rainbow trout, and (7) frog muscle parvalbumin.

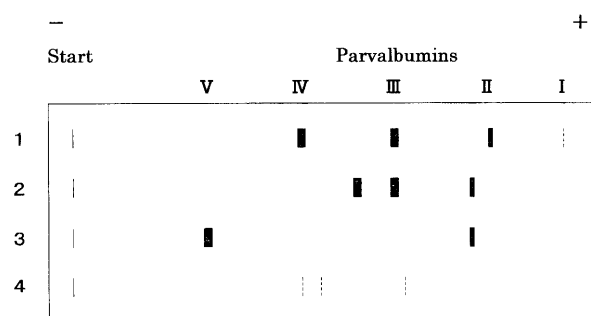


Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoretogram of parvalbumins from some fish muscles. Water-soluble fraction was directly applied to the gel. Parvalbumins were selectively stained with ruthenium red. (1) carp, (2) pacific cod, (3) pacific saury, and (4) rainbow trout.

Table 1. Distribution of calcium in the high molecular weight fractions (HMW), the parvalbumin fractions (PA), and the low molecular weight fractions (LMW) in water-soluble fraction of fish muscle

sample	HMW	PA	LMW
carp	4.0	64.9	31.1
pacific cod	13.1	67.0	19.9
pacific saury	6.3	11.6	81.6
rainbow trout	2.0	7.5	90.4

これらの画分のカルシウムの存在割合を求めるとそれぞれ 4.0, 64.9 および 31.1% となった。遊離カルシウムはごく少量であった。つまりコイの普通肉水可溶性画分のカルシウムは、PA 画分に水可溶性画分の約 65% が分布することが示された (Table 1)。

マダラ 水可溶性画分のゲルろ過の結果を Fig. 1-b に示した。コイと同じように 280 nm における吸収は Fr.23, 37 および 84 にピークが認められた。カルシウム濃度は、コイと同じように Fr.37 に大きなピークとして

認められた。カルシウムは高分子画分に 13.1%, PA 画分に 67.0%, 低分子画分に 19.9% 存在した (Table 1)。遊離カルシウムはごく少量であった。Fr.37 画分の紫外部吸収スペクトルは 269.6, 274.8, 280.4 および 290.8 nm に吸収極大があり, 269.6 nm が最も高く, 典型的な PA のスペクトルと類似していた。この分子量は SDS-PAGE で 11.5 kDa と推定された (Fig. 2-4)。PAGE では 3 本のバンドが検出され (Fig. 3-2), これらはすべてルテニウムレッドとの反応が認められたので PA であると確認した。

サンマ 水可溶性画分のゲルろ過の結果を Fig. 1-c に示した。280 nm における吸収のピークは, Fr.23, 73 および 79 にあったが最後のピークが非常に大きかった。PA 画分にはピークは認められなかった。カルシウム濃度では Fr.36 にも小さなピークが認められたが, Fr.79 に非常に大きなピークが認められ, コイやマダラと明らかに異なっていた。カルシウムは高分子画分に 6.3%, PA 画分に 11.6%, 低分子画分に 81.6% 存在していた (Table 1)。Fr.37 付近の紫外部吸収スペクトルを測定したところ, 252.7, 258.9 および 265.1 nm に吸収極大があり, 258.9 nm が最も高く, PA が存在していることがわかった。サンマ PA の分子量は SDS-PAGE では 11.5 kDa と推定され (Fig. 2-5), コイおよびマダラのそれより若干大きかった。PAGE では 6 本のバンドが存在し, そのうち成分 V の近傍のバンドと, 成分 III と II の間のバンドはルテニウムレッドとの反応が認められた (Fig. 3-3) が, その他の 4 本のバンドはルテニウムレッドと反応しなかった。

ニジマス 水可溶性画分のゲルろ過の結果を Fig. 1-d に示した。280 nm における吸収は Fr.24, 64 および 75 にピークが認められたが, Fr.37 にはピークは認められなかった。PA が溶出される位置でのカルシウム量はサンマの場合より少なく, ほとんどのカルシウムは低分子画分に検出された。カルシウム分布は高分子画分に 2.0%, PA 画分に 7.5%, 低分子画分に 90.4% となった。Fr.37 の紫外部吸収スペクトルを測定したところ, 254.0, 259.5 および 265.5 nm に吸収極大があり, 259.5 nm が最も高かったことから, 量的には少ないが明らかに PA が存在していると判断された。この PA の分子量は, SDS-PAGE では 11.2 kDa と推定された (Fig. 2-6)。PAGE では成分 IV, III と IV の間および III の近傍に非常に薄い 3 本のバンドがみられた (Fig. 3-4)。これは泳動に用いた試料中の PA 含量が少なかったことによると考えられる。

PA の含量 4 魚種について普通肉 PA の含量を測定した。コイ PA をスタンダードとして HPLC により測定したところ, 普通肉 100 g 当たり, コイで 680 mg, マダラで 717 mg, サンマで 97 mg, ニジマスで 163

mg となった。

考 察

水可溶性画分のカルシウムの分布をゲルろ過により調べた結果、コイおよびマダラはその約 65% が PA と結合して存在していることが認められた。また、サンマおよびニジマスでは PA 画分のカルシウムは少なく大部分 (80-90%) は低分子画分に分布していた。PA 画分のカルシウムが少ないのは PA そのものが少ないためである。抗コイ PA 抗体を用いた ELISA による測定²⁸⁾をおこなったところ、普通肉 100 g 当たりコイで 600 mg, マダラで 460 mg, サンマで 110 mg, ニジマスで 87 mg であり、HPLC による結果やゲルろ過の結果と傾向は一致した。普通肉におけるカルシウムは、抽出液中では PA のような水溶性カルシウム結合タンパク質だけでなく、低分子物質と何らかの相互作用を持ちながら存在し、遊離型はごく少量であった。魚種間で、カルシウム分布が大きく異なったことは、PA などのカルシウムと結合する物質の種類やそれらの量的な違いを反映していると言える。これらの違いは大変興味深い。

今回は、細胞が刺激を受け、細胞内のカルシウム濃度が上昇した濃度と同程度の 5×10^{-6} M のカルシウムを緩衝液に入れゲルろ過を行ったが、この濃度では PA はほぼ完全に Ca と結合しているが、未同定の低分子物質もカルシウムと強く結合していると思われる。しかし生体内において、細胞が刺激を受けていない生理的な状態のカルシウム濃度である 10^{-7} M 付近で、低分子物質がカルシウムと結合して存在しているかどうかは今後の検討課題である。

PA は、魚類普通肉に多量に存在し、その量は哺乳類より高い。³⁰⁾ マダラとサンマで含量に約 7 倍の開きがあり、魚種間でも含量に差が認められた。

筋肉における PA の役割については、筋小胞体と筋原繊維間でのカルシウムのやりとりにおける緩衝作用の働きにあると推定されている。すなわち収縮状態において細胞中のカルシウムイオンをキレートし、その濃度を収縮に必要な閾値以下として弛緩の速度を速めるという考え方³¹⁾である。一般に、魚類の普通肉において、PA 含量はミオグロビン量に反比例していると考えられている。^{2,31)} 今回の分析では、赤身魚普通肉においてもサンマのように高含量認められたのものもあることから、ミオグロビン含量とかならずしも反比例するとは言いがたい。

魚類普通肉の PA は、魚種間で分子量および電気的性質の違いが認められた。PAGE ではコイで 3 種、マダラで 3 種、サンマで 2 種、ニジマスで 3 種のアイソフォームが認められた。魚類普通肉では 5 種類の PA の存在が報告されている。コイ科の魚では I ~ IV, I ~ III と

V などの報告があり混乱している。^{25,26)} タラ類では II と III を主成分とし 1~3 種存在し、魚種により異なっている。³²⁾ また個体差も存在する。等電点電気泳動でも多数のバンドが認められている。^{33,34)}

今回の分析では、魚種間で PA の分子量に約 2500 の差が認められた。また、魚種間で、電気泳動の移動度の違いから電気的性質が異なるものが多数認められ、それぞれの構成アミノ酸の数や種類の違いが考えられる。移動度の大きくことなる成分については、カルシウムとの結合定数の違いなども示唆されるので、今後検討する必要がある。

これら PA については、魚種を広げ普通肉における含量、アイソフォームおよび性質などについて検討中である。

高等脊椎動物では α -PA のみ存在しアイソフォームの存在が認められていない。³⁵⁾ また、ニワトリでは組織に特異的に存在する β -PA が報告されている。³⁶⁾ 進化の過程で、高等脊椎動物ではアイソフォームが失われ単一になったと考えられるが、それについては多くの動物について分析、検証される必要があろう。

文 献

- 1) 讃岐 齊, 秦 正弘, 竹内昌昭. 魚介類筋肉におけるカルシウムの含量と分布. 日本誌 1999; **65**: 480-487.
- 2) Gerday CH. Soluble calcium binding proteins in vertebrate and invertebrate muscles. In: Gerday CH, Bolis L, Gills R (eds) *Calcium and Calcium Binding Proteins* Springer-Verlag, Berlin, 1988; 23-39.
- 3) Pecchere JF, Demaille J, Capony JP. Muscular parvalbumins: Preparative and analytical methods of general applicability. *Biochim. Biophys. Acta* 1971; **236**: 391-408.
- 4) Cox JA, Kohlar L, Benzonana G. Ionic composition and distribution of myogen proteins in the tail muscle of fresh water crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 1976; **53B**: 101-105.
- 5) Gerday CH, Collin S, Gerardin-Othiers N. The soluble calcium-binding protein from muscle of the sandworm, *Nereis virens*. *J. Muscle Res. Cell Mot.* 1981; **2**: 225-238.
- 6) Gills JM. Relaxation of vertebrates skeletal muscle. A synthesis of the biochemical and physiological approaches. *Biochim. Biophys. Acta* 1985; **811**: 97-145.
- 7) 小島 至. 「カルシウムと細胞情報」(一戸裕子編) 羊土社, 東京. 1994; 11-146.
- 8) Heizmann CW. Parvalbumin, an intracellular calcium-binding protein; distribution, properties and possible roles in mammalian cells. *Experientia* 1984; **40**: 910-921.
- 9) Gerday CH. Soluble calcium-binding proteins from fish and invertebrate muscle. *Mol. Physiol.* 1982; **2**: 63-87.
- 10) Focant B, Laleye P, Vandewalle P. Biochemical attempt to characterize thirteen cichlid species by muscular parvalbumins. *Archives internationales de Physiologie, de Biochimie et de Biophysique.* 1994; **102**: 135-138
- 11) Rodonick KJ, Sidell BD. Effects of body size and thermal acclimation on parvalbumin concentration in white muscle of striped bass. *J. Exp. Zool.* 1995; **272**: 266-374.
- 12) Focant B, Melot F, Collin S, Chikou A, Vandewalle P,

- Huriaux F. Muscle parvalbumin isoforms of *Clarias gariepinus*, *Heterobranchus longifilis* and *Chrysichthys auratus*: isolation, characterization and expression during development. *J. Fish Biol.* 1999; **54**: 832–851.
- 13) Aas K, Jebsen JW. Studies of hypersensitivity in fish. Partial purification and crystallization of a major allergenic component of cod. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1967; **32**: 1–20.
 - 14) Pecchre JF, Derancourt J, Haiech J. The participation of parvalbumins in the activation-relaxation cycle of vertebrate fast skeletal muscle. *FEBS Lett.* 1977; **75**: 111–114.
 - 15) Heizmann CW, Berchtold MW, Rowleson AM. Correlation of parvalbumin concentration with relaxation speed in mammalian muscles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982; **79**: 7243–7247.
 - 16) Berchtold MW, Heizmann CW, Wilson KJ. Ca^{2+} -binding proteins: A comparative study of their behavior during high-performance liquid chromatography using gradient elution on reverse-phase supports. *Anal. Biochem.* 1983; **129**: 120–131.
 - 17) Gerday CH, Teuwis J-C. Isolation and characterization of the main parvalbumins from *Raja clavata* and *Raja montagui* white muscles. *Biochim. Biophys. Acta* 1972; **271**: 320–331.
 - 18) White HD. Kinetic mechanism of calcium binding to white parvalbumin. *Biochemistry* 1988; **27**: 3357–3365.
 - 19) Ornstein L. Disk electrophoresis—I. Background and theory. *N. Y. Acad. Sci.* 1964; **121**: 321–349.
 - 20) Davis BJ. Disk electrophoresis—II. Method and application to human serum proteins. *N. Y. Acad. Sci.* 1964; **121**: 404–436.
 - 21) Charuk JHM, Pirraglia CA, Reithmeier RAF. Interaction of ruthenium red with Ca^{2+} -binding proteins. *Anal. Biochem.* 1990; **188**: 123–131.
 - 22) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680–685.
 - 23) Wilson KJ, Wiering EV, Klauser S, Berchtold MW. Comparison of high-performance liquid chromatography of peptides and proteins on 100- and 300-Å reversed phase supports. *J. Chromatogr.* 1982; **237**: 407–416.
 - 24) Piront A, Gerday CH. Parvalbumin of the Cyprinidae *Chondrostoma nasus* L. white muscles—purification and characterization. *Comp. Biochem. Physiol.* 1973; **46B**: 349–359.
 - 25) Piront A, Gosselin-Rey C. Immunological cross-reactions among cyprinidae parvalbumins. *Biochem. Sys. Eco.* 1974; **2**: 103–107.
 - 26) Bobak P, Slechta V. Comparison of parvalbumins of some species of family cyprinidae. *Comp. Biochem. Physiol.* 1988; **91B**: 697–699.
 - 27) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979; **76**: 4350–4354.
 - 28) Celio MR, Baier W, Schärer L, De Viragh PA, Gerday CH. Monoclonal antibodies directed against the calcium binding protein parvalbumin. *Cell Calcium* 1988; **9**: 81–86.
 - 29) 讃岐 斉. 魚介類筋肉におけるカルシウム結合タンパク質に関する研究. 博士論文, 東北大学, 仙台. 1997; 54–79.
 - 30) Hamoir G, Gerardin-Othiers N, Focant B. Protein differentiation of the superfast swimbladder muscle of the toadfish *Opsanus tau*. *J. Mol. Biol.* 1980; **143**: 155–160.
 - 31) 橋本昭彦, 松浦 基. 魚類骨格筋の生化学的特性. 「蛋白質 核酸 酵素」共立出版, 東京. 1989; **34**: 43–52.
 - 32) Piront A, Gosselin-Rey C. Immunological cross-reactions among gadidae parvalbumins. *Biochem. Sys. Eco.* 1975; **3**: 251–255.
 - 33) Girija N, Rehbein H. Comparison of parvalbumin patterns from different fish species by isoelectric focusing of muscle extracts. *Comp. Biochem. Physiol.* 1988; **91B**: 723–728.
 - 34) Esteve-Romero JS, Yman IM, Bossi A, Righetti PG. Fish species identification by isoelectric focusing of parvalbumins in immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 1996; **17**: 1380–1385.
 - 35) Fohr UG, Weber BR, Muntener M, Staudenmann W, Hughes GJ, Frutiger S, Banville D, Schafer BW, Heizmann CW. Human α and β parvalbumins. Structure and tissue-specific expression. *Eur. J. Biochem.* 1993; **215**: 719–727.
 - 36) Kuster T, Staudenmann W, Hughes GJ, Heizmann CW. Parvalbumin isoforms in chicken muscle and thymus. amino acid sequence analysis of muscle parvalbumin by tandem mass spectrometry. *Biochemistry* 1991; **30**: 8812–8816.