

이담자 효모균의 성분화과정에서 막단백질 중 Ca^{2+} -ATPase와 trigger peptidase(TPase)의 상호관계

정영기* · 이태호¹ · 정경태

동의대학교 미생물학과, ¹부산대학교 미생물학과

Relation of Ca^{2+} -ATPase and Trigger Peptidase(TPase) that are Membrane Proteins in a Differentiation Process on Heterobasidiomycetous Yeast

Jeong, Yong-Kee*, Tae-Ho Lee¹ and Kyung-Tae Jeong

Department of Microbiology, Dong Eui University, Pusan 614-714, Korea

¹Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract — We have studied the relation between Ca^{2+} -ATPase and trigger peptidase(TPase) which are membrane protein well known as their significant role for signal transduction of mating pheromone in heterobasidiomycetous yeast, *Rhodospidium toruloides*. We found out that there were Ca^{2+} -ATPase and TPase together in isolated calmodulin binding protein(CBP), using calmodulin affinity column chromatography after solubilization of mating type a cell membrane protein, and that the dependence of enzyme activity of both the enzymes on Ca^{2+} , phospholipid and nonionic detergent are similar. However, Ca^{2+} -ATPase had quite absolute dependence on calmodulin and, on the other hand, TPase didn't have any dependence. Judging from the fact that there are both enzymes in CBP which the dependence of calmodulin are quite different, we found out that both enzymes were made to their compound and existed in mating type a cell membrane.

이담자균 효모 *Rhodospidium toruloides*(1)는 접합형이 서로 다른 A형과 a형으로서 존재하고 있으며 1배체에서는 각각 출아분열에 의하여 영양증식을 행하고 있다(2).

이 균들은 영양증식과정에서 상호간에 상대접합형 영양세포에 성 분화를 유도하는 sexual pheromone을 분비하는데, A 세포는 rhodotorucine A를 구성적으로 분비하고 a형 세포는 rhodotorucine a를 유도적으로 분비한다.

영양세포는 상대세포의 sexual pheromone을 수용하여 세포주기의 G1기에서 영양증식을 멈추고 상대 접합형 세포를 향하여 긴 접합관을 생성하면서 생식 세포로 분화한다. 접합형 A세포가 생산분비하는 rhodotorucine A는 1975년 Abe 등(2)에 의하여 발견되어 정제된 후, 1978년 Kamiya 등에 의하여 화학 구조가

결정되었으며(3), 그 구조는 화학합성에 의하여 확인되었다. Rhodotorucine A의 구조는 11개의 amino잔기로 되어 있고 C말단의 cysteine이, polyisoprenoid, farnesyl기로서 수식된 lipopeptide형태로 되어 있다.

Rhodotorucine A의 정보가 표적세포인 a세포 내에 전달되는 과정의 연구에서, a세포와 rhodotorucine A를 함께 incubation시킨 결과 pheromone은 세포표면과 접촉함으로써 가수분해되어 실패됨을 알 수 있었다(4). 이 결과는 세포표면에 pheromone을 가수분해하는 물질이 존재함을 강하게 시사한다. 그 후 a세포표면에는 trypsin형의 thiol계 endopeptidase가 pheromone 대사에 관여하고 있음을 알게 되었다(5).

Miyakawa 등(6)은 a세포표면에 존재하는 효소형 수용체에 대해 trigger peptidase(TPase)라 명명했고 이를 세포표면으로부터 분리정제하여 그 특이성과 제성질을 파악했다. 또, Jeong 등(7)은 정제된 TPase를 phospholipid liposome에 reconstitution 하는데 성공했다.

한편, a세포표면의 TPase에 의하여 rhodotorucine

Key words: *Rhodospidium toruloids*, Ca^{2+} -ATPase, trigger peptidase, sexual differentiation, membrane proteins

*Corresponding Author



Fig. 1. Structure of Rhodotorucine A.

A가 가수분해되면서 성분화를 위한 signal이 세포내에 전달됨과 동시에 a세포내의 Ca^{2+} 의 농도가 급격히 증가되는 상태가 발생했다(7, 8). 이는 세포내의 Ca^{2+} 농도를 조절하는 Ca^{2+} -pump계에서 동적에너지 발생에 역할을 하는 Ca^{2+} -ATPase의 작용이 필수적일 것으로 예상된다.

본 연구에서는 TPase와 Ca^{2+} -ATPase가 세포막에 존재하면서 세포가 성 phomone의 수용과 성 분화하는 과정에서 상호 중요한 관계를 유지할 것으로 기대하고 이를 파악할 것을 목적으로 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양

균주는 *Rhodospiridium toruloides* IFO 059-M919 (접합형A)와 *R. toruloides* IFO 0880-M1057(접합형 a)을 사용했으며, 배양은 500 ml의 진탕 flask에 chloramphenicol 50 μ g을 첨가한 YPG배지 100 ml를 배양 온도 28°C에서 행했다.

Rhodotorucine A

Merrifield의 방법(9)에 따라서 고상법을 이용하여 합성했다. 합성된 peptide는 Katada 등의 방법(10)에 의하여 peptide의 c-말단에 farnesyl기를 부가하였다.

합성된 rhodotorucine A는 생물활성검정을 거쳐 활성의 유무를 확인한 후에 실험에 사용하였다.

세포막 단백질의 가용화

a세포를 500 ml 진탕 flask에 YPG 배지 100 ml 단위로 배양한 후, 대수증식기(3×10^7 cells per ml)에서 집균하였다. 균체를 각 1 mM의 EDTA, DTT, PMSF가 함유된 10mM Tris-HCl buffer(pH 7.3 이하 buffer A라 함)로 2회 세척 후 sonication(ultrasonic processor model VC-1500)에 의하여 파쇄하였다. 20분간 원심분리(11,000×g)하여 얻은 침전물을 다시 상기의 buffer A로 3회 씻고 4%의 Nonidet-40(NP-40)에 현탁하였다. 위의 현탁액을 1분간 sonication함으로써 막단백질을 추출하였다. 4°C에서 약 1시간 방치한 후 원심분리(11,000×g, 60분)하여 상층을 취하여 세포막단백질 가용분획으로 하였다(6).

Calmodulin binding protein(CBP)의 분리

세포막가용화 분획을 calmodulin(CaM)-Sephrose 4B로 제작한 CaM-affinity column chromatography에 흡착시켜 buffer A에 0.1% NP-40을 함유한 0.5 M NaCl을 가한 용출액으로 용출시킴으로써 CBP을 얻을 수 있었다.

여기서 얻은 활성 fraction은 EDTA를 제거한 buffer A를 외액으로 하여 약 12시간 이상 투석을 행한 후 시료로 사용했다.

Ca^{2+} -ATPase의 활성측정

50 μ M $CaCl_2$, 120 mM KCl, 30 mM HEPES, 0.5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM K.ATP를 함유한 반응액 100 μ l에 기질로서 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 5×10^3 cpm을 가하여 총반응액으로 하였다. 상기의 반응액에 효소액 30 μ l을 가하여 28°C에서 각각의 시간별로 반응하였다. 반응종료는 10 N H_2SO_4 100 μ l을 가함으로써 행했으며, 1.1% ammonium molybdate 0.9 ml을 가한 후 iso-butanol : benzene(1 : 1) 1 ml로서 유리된 인산을 추출하였다.

효소활성은 효소반응에 의하여 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 로부터 유리되어 나온 인산을 측정함으로써 구하였다.

TPase의 활성측정

Miyakawa 등(6)의 방법에 의하여 측정하였다. 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.3) 1 mM $CaCl_2$, 0.1 mM dithiothreitol(DTT), 0.3 mM NP-40, 0.07 mM phosphatidyl serine(PS)을 함유한 반응액 1 ml에 20U의 rhodotorucine A와 효소액으로서 CBP 정제액 10 μ l을 첨가하여 28°C에서 반응시켰다. 효소활성은 rhodotorucine A를 실험시키는 정도로서 결정하였다. 여기서 TPase 1U라 함은 1분간에 1U의 rhodotorucine A 활성을 실험시키는 것으로 정한다.

결과 및 고찰

막단백질의 가용화 분획에서의 TPase와 Ca^{2+} -ATPase 활성 존재

TPase는 세포막의 bilayer에 관통하여 존재하고 있으면서 rhodotorucine A의 정보를 수용하여 세포내로 전달한다(7). a세포가 pheromone의 정보를 수용함과 동시에 세포내의 Ca^{2+} 농도가 순간적으로 증가함을 알았다(8). 만약, Ca^{2+} -ATPase가 막에서 세포내의 Ca^{2+} 의 농도를 조절하는 역할을 한다면 막가용화 단백질 중에는 TPase와 Ca^{2+} -ATPase가 함께 존재하는 것은 당연한 사실일 것이다. 이를 확인하기

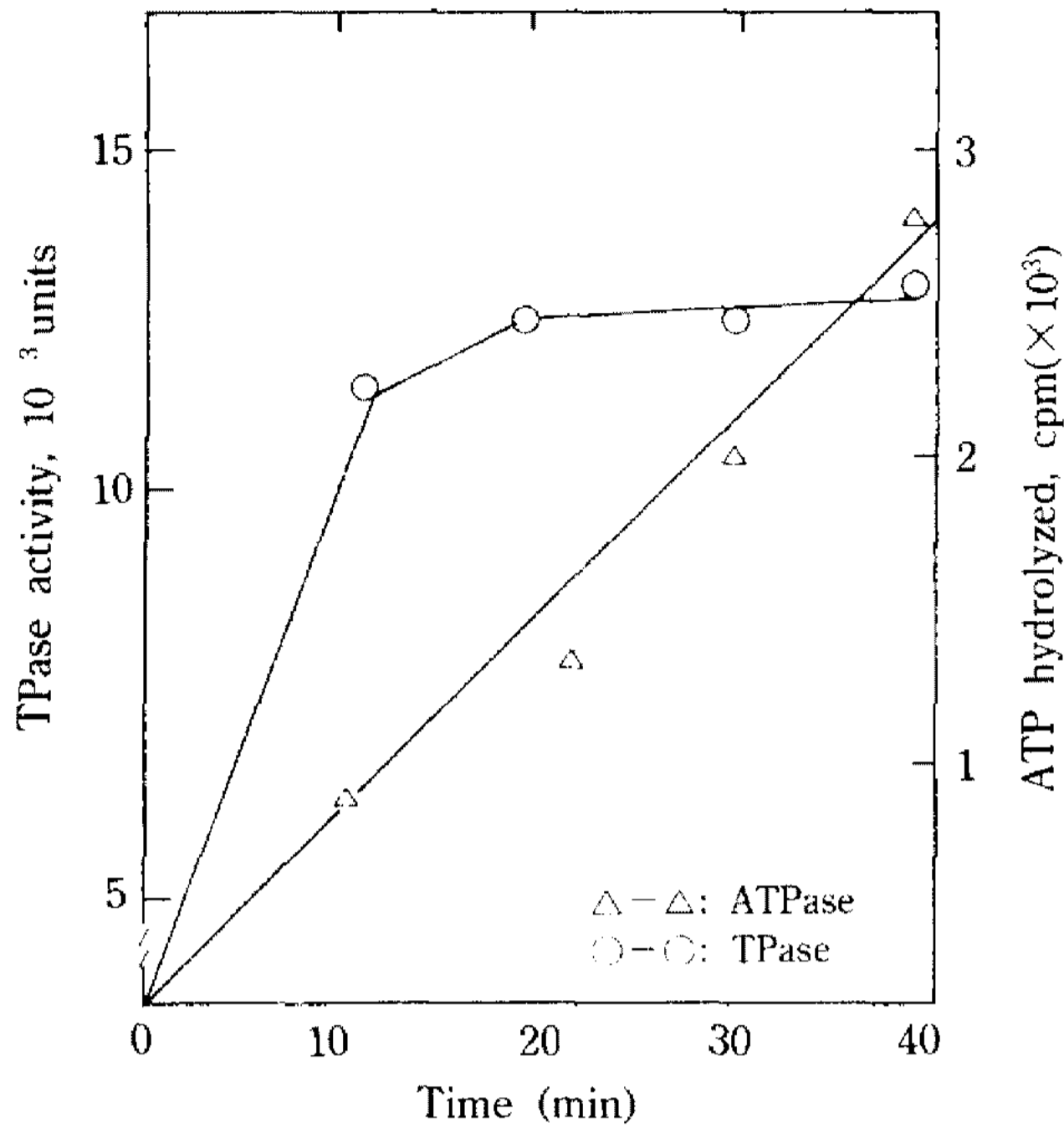


Fig. 2. Activity of TPase and ATPase in solubilized membrane protein of *R. toruloides* IFO 0880-M1057(a type).

ATPase reaction was started by the addition of [γ -³²P]ATP and terminated by the addition of 100 μ l of 10 N H₂SO₄. The amount of ³²Pi was determined using a liquid scintillation spectrometer by the isobutanol-extraction procedure as described (Materials and Method). TPase was assayed biologically by the ability to decrease the the pheromonal activity of rhodotorucine A. One unit of TPase was defined as that amount of enzyme which catalyzed the inactivation of 1 unit rhodotorucine A in 1 min.

위하여 막단백질의 가용화분획(세포수 3×10^7 개에 해당하는 단백질량)에서 우선 TPase와 ATPase의 활성을 확인하였다. 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 본 가용화분획에는 두 효소가 함께 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 막단백질인 두 효소가 동일한 비이온성 계면활성제에 의하여 막 분획으로부터 가용화되는 것으로 보아 막에서 거의 비슷한 형태로 존재하거나, 또는 긴밀한 양상으로 존재하고 있음을 강하게 시사한다. 그러나 여기서 ATPase는 Ca²⁺-ATPase이라야 본 signal 전달계에서의 역할이 인정되므로 이의 확인이 중요하다 하겠다.

a세포가 sexual pheromone을 수용함과 동시에 세포내의 Ca²⁺농도가 급격히 증가하는 현상은 pheromone 정보의 전달 시 Ca²⁺이 second messenger로서 작용할 가능성을 시사하고 있다(8). 막에 있어서도 Ca²⁺과 관련된 단백질이 존재할 것으로 기대하고 Ca²⁺-binding protein의 탐색을 시도했으나 발견하지 못하고 대신에 calmodulin-affinity column chromatography에 의하여 CBP를 분리하였다.

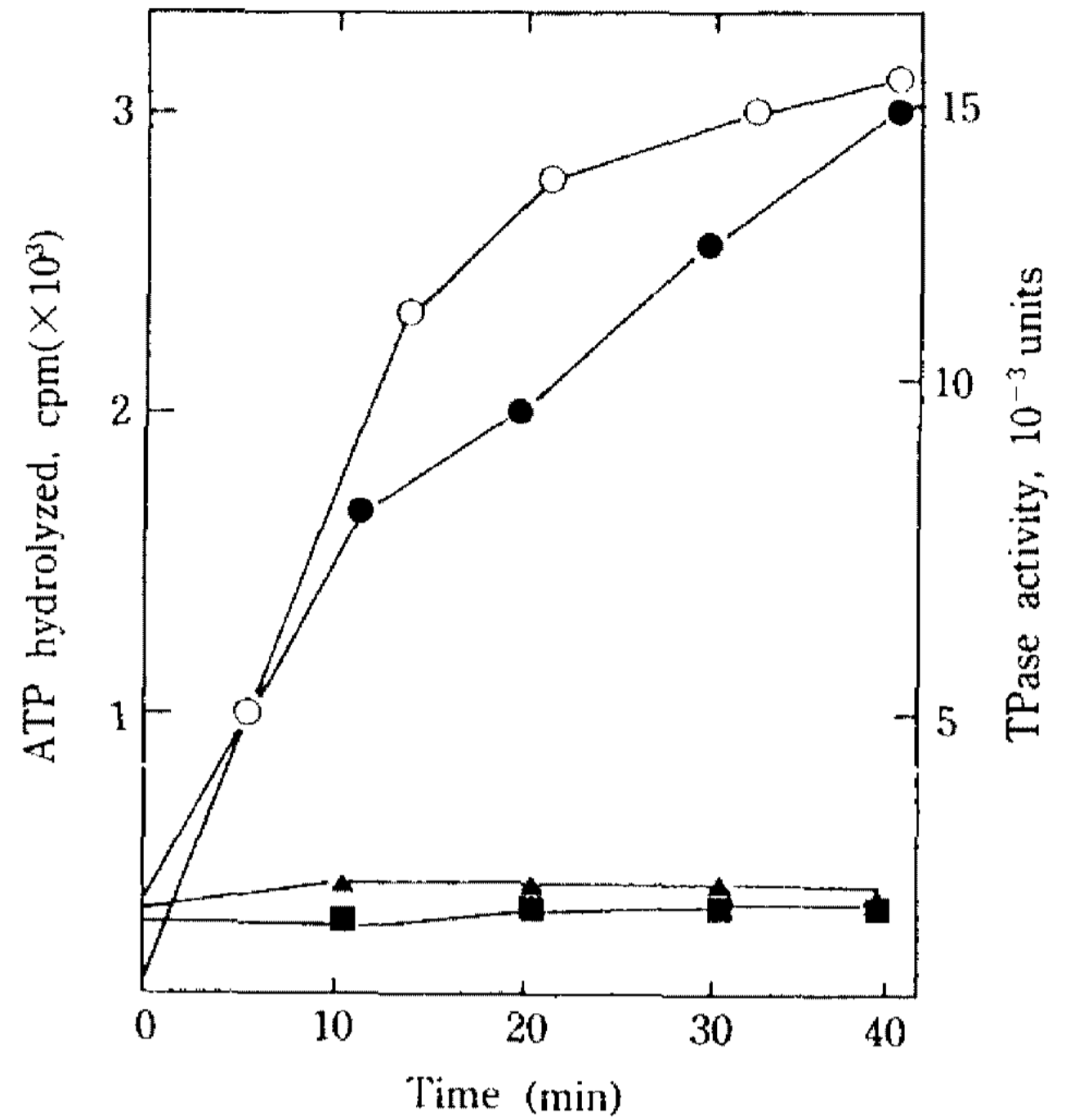


Fig. 3. Activity of TPase and ATPase in calmodulin binding proteins (CBP).

The enzyme activity was measured as described in "Materials and Methods" and Fig. 2.

●, CBP; ▲, added EGTA on CBP; ■, only [γ -³²P]ATP; ○, TPase activity.

graphy에 의하여 CBP를 분리하였다.

CBP의 분리와 TPase 및 ATPase의 확인

막가용화분획에 존재했던 TPase와 ATPase가 분리된 CBP에도 존재하는지의 여부는 두 효소의 관계를 파악하는 중요한 계기가 될 것이다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 TPase 약 5 μ g에 해당하는 단백질 량으로 약 20U의 rhodotorucine A(Rh.A)를 약 20분 전후에서 거의 분해시키는 활성을 보였다. 그러나 이 활성은 다른 protease에 의한 Rh.A의 분해작용일 가능성을 배제할 수 없기에 이의 확인은 본 효소의 성질 파악에서 명백히 하기로 한다.

또한, Ca²⁺-ATPase의 활성은 [γ -³²P]ATP를 기질로 하여 분리 CBP와 28°C에 반응시켜 유리된 ³²Pi를 측정함으로써 행했다. 그 결과 ATPase의 활성은 반응시간에 따라 거의 직선에 가까운 활성패턴을 보였다. 본 연구에서 ATPase는 Ca²⁺-ATPase가 아니면 의미가 없으므로 EGTA로서 이를 확인하였다.

본 ATPase의 활성은 EGTA에 의하여 완전히 저해됨으로서 Ca²⁺-ATPase임을 강하게 시사했다(Fig. 3 참조). 그러므로 앞으로 본 연구에서 Ca²⁺-ATPase의 부분정제라 함은 CBP의 단리에 의하여 얻어진 표품을 의미한다.

CBP(calmodulin binding protein)에 존재하는 TPase의 성질

Rh.A의 정보를 수용하는 TPase의 성질은 Miyakawa와 Jeong 등에 의하여 보고된 바 있다(6). 본 CBP에 존재하는 TPase 활성도 Rh.A의 정보전달에 필수적인 역할을 하는 수용체인 TPase와 동일하지 않으면 의미가 없다.

가장 중요한 것은 TPase는 -SH기를 가지는 thiol계 protease이므로 -SH기 제거제인 DTNB(5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoic acid)에 의한 저해작용의 확인이다. 실험결과는 Fig. 4에서 보이는 바와 같이 CBP 중의 TPase는 DTNB에 의하여 거의 완벽하게 저해되었으므로 Rh.A의 수용체 역할을 하는 TPase와 동일 물질임을 확인하였다. 그리고 TPase는 절대적인 Ca^{2+} 요구성 protease이며 저해제로서는 antipain이 가장 효과가 있었다(6). 이들 결과가 CBP내의 TPase를 비교하여 볼 때 일치하는 것을 확인할 수 있었다. 그러므로 본 CBP에는 Rh.A의 정보를 수용하는 TPase가 존재함을 알 수 있었다.

CBP에 존재하는 ATPase의 성질과 Rh.A의 영향

ATPase는 ATP를 가수분해하여 ADP와 유리인산을 생성하는 효소로서 그 중, Ca^{2+} -ATPase는 ADP생성 중 발생하는 에너지로 Ca^{2+} -pump를 움직여 세포내 Ca^{2+} 의 농도를 조절하는 역할을 하며 효소활성은 절대적인 Ca^{2+} 의존성이다. 본 CBP에 존재하는 ATPase가 Ca^{2+} -ATPase인지를 확인하였다. EGTA를 가함으로써 효소액과 반응액에서 Ca^{2+} 을 제거한 후 효소활성을 측정된 결과 거의 완벽하게 저해현상을 보

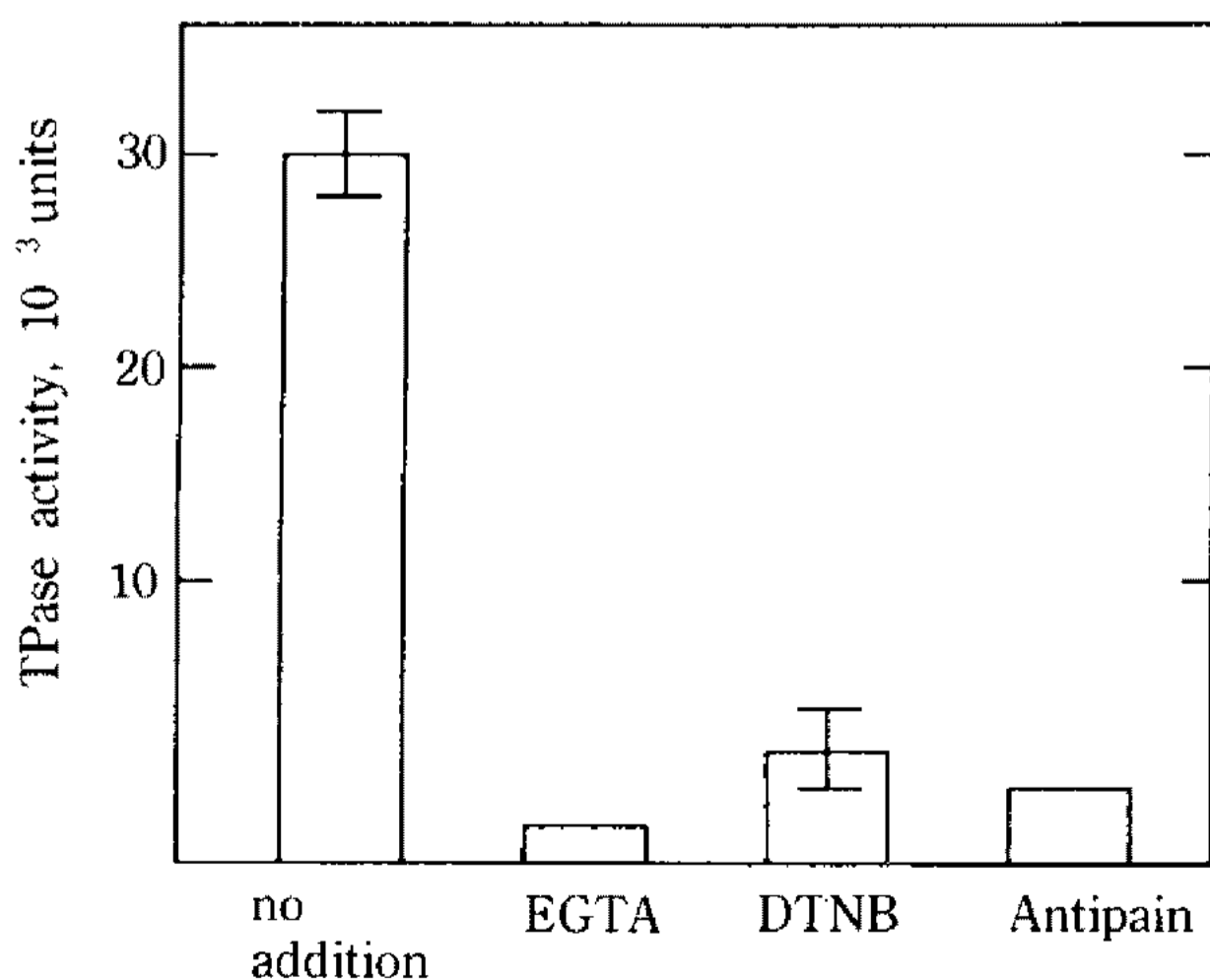


Fig. 4. Properties of TPase in CaM binding protein. TPase activity was measured as described "Materials and Methods". Antipain is inhibitor of TPase (12).

였으며, 이후 최종 농도인 2 mM의 Ca^{2+} 를 첨가하는 것에 의하여 활성이 복귀되었다. 이상의 결과는 본 효소가 Ca^{2+} -ATPase임을 강하게 시사하는 것이 된다. 또한, Ca^{2+} -ATPase가 Rh.A의 정보전달에 중요한 역할을 한다면, Rh.A와 Ca^{2+} -ATPase 사이에는 어떤 형태이던 상호 영향을 주는 관계가 성립되고 있으리라 예상된다.

Rh.A 32U를 Ca^{2+} -ATPase의 반응액에 첨가하여 효소반응을 본 결과, Ca^{2+} -ATPase의 활성이 급격히 저해됨을 알았다. 이 현상은 $NaIO_4$ 로서 Rh.A의 C말단을 산화시켜 pheromone 활성을 실행시킨 Rh.A sulfoxide(Rh.A-O)에 의해서는 활성이 복귀된 결과를 미루어 볼 때 Ca^{2+} -ATPase의 활성저해 현상은 Rh.A의 활성에 의한 작용이 명확하다(Fig. 5 참조). 이 결과는 이전에 Miyakawa 등(11)이 발표한 결과와 일치하였다.

이상의 결과로 예측컨데, Rh.A가 세포표면에서 수용되어 transmembrane할 때 Ca^{2+} -ATPase는 그 활성이 저해되고 동시에 Ca^{2+} -pump의 작용을 멈추게 된다. 그 영향으로 세포내의 Ca^{2+} 농도는 급증현상을 보이는 것으로 설명할 수 있다.

CaM(calmodulin)이 두 효소에 미치는 영향

TPase와 Ca^{2+} -ATPase는 세포막으로부터 분리된 CBP 중에 함께 존재하는 효소이므로 이들은 CaM과 필수적인 관계를 갖고 있으리라 예상된다. 그러므로 두 효소의 활성이 CaM에 어떤 영향을 받는지 알아 보았다.

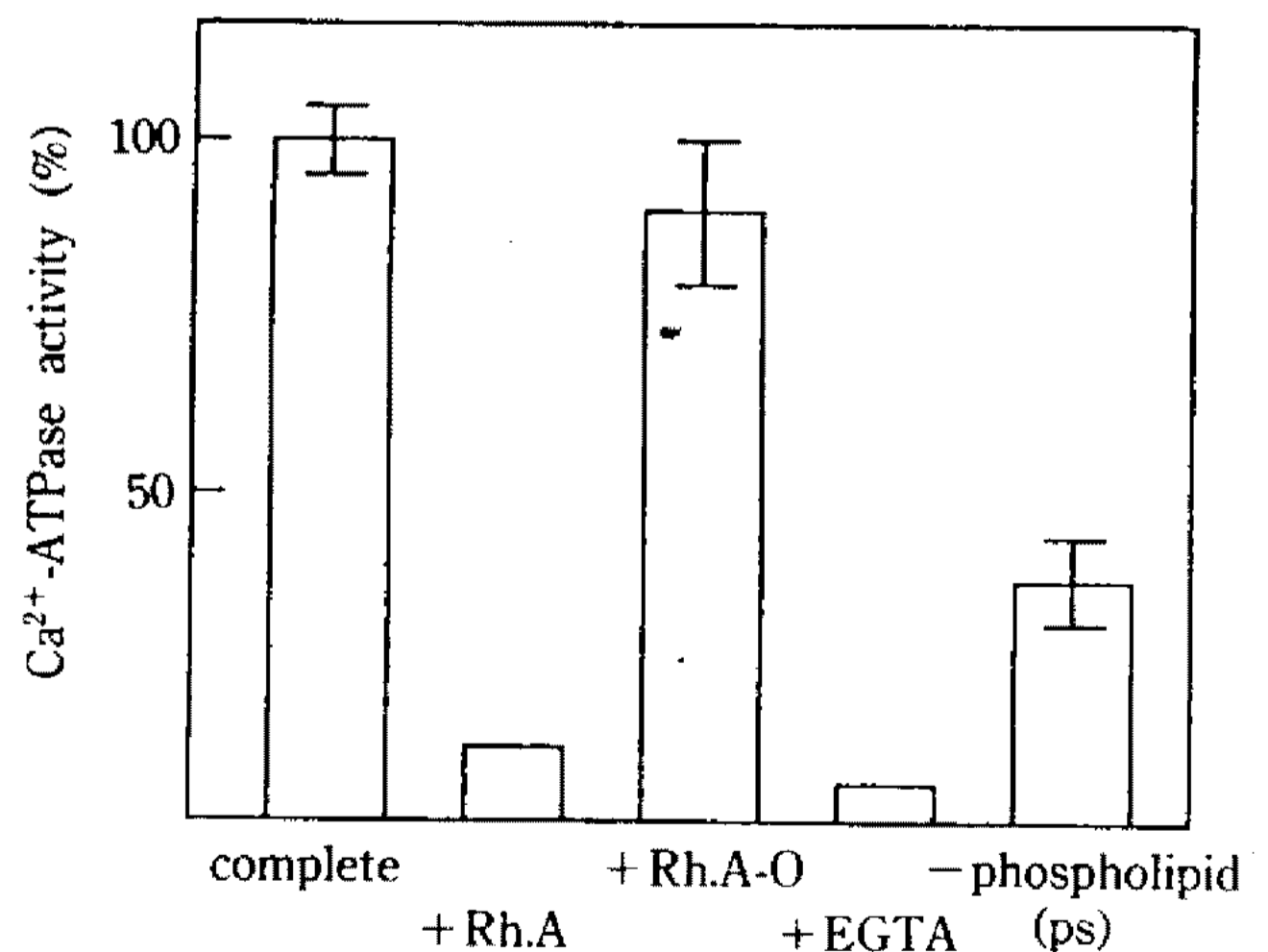


Fig. 5. Effect of Rh.A and some properties on Ca^{2+} -ATPase in CaM binding protein. Preparation of Rh.A-O (Rhodotorucie A S-oxide) was performed by oxidation of rhodotorucine A as described in reference (10).

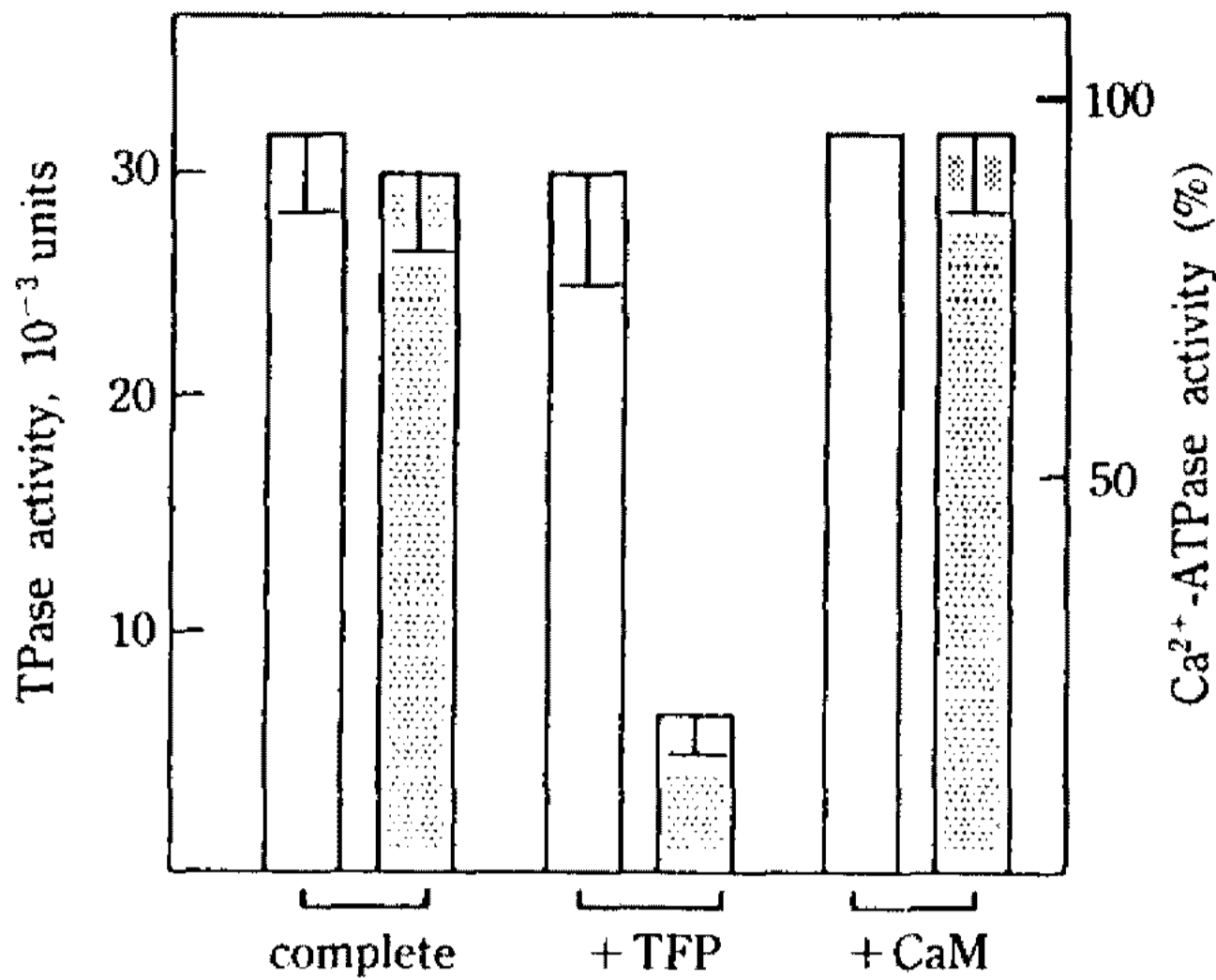


Fig. 6. Effect of calmodulin on TPase and Ca²⁺-ATPase in CaM binding protein.

TFP, Trifluoperazine (calmodulin inhibitor); □, TPase; ■, Ca²⁺-ATPase, Complete: added Ca²⁺ and CaM in enzyme.

먼저, 두 효소를 CaM 저해제인 trifluoperazine (TFP)을 가하여 활성변화를 본 결과 Fig.6에서 보는 바와 같이 TFP는 TPase에는 전혀 활성에 변화를 보이지 않는 반면 Ca²⁺-ATPase에는 80% 정도의 활성저해를 보였다. 그러나 그 저해반응은 다시 CaM을 첨가함에 따라 활성이 복귀되었다.

이상의 결과로 볼 때, 두 효소 중 TPase는 CaM에 영향을 받지 않고 있으며 Ca²⁺-ATPase는 절대적인 CaM 의존성 효소인 것을 알 수 있다. CaM과는 무관한 TPase가 분리 CBP 중에서 CaM에 의존적인 Ca²⁺-ATPase와 함께 존재하는 것은 이 두 효소가 막에서 강한 복합체를 형성하고 있음을 시사하는 것이다.

두 효소의 성질 비교

CaM affinity column 에 의하여 분리된 CBP 중에 동시에 존재하는 TPase와 Ca²⁺-ATPase 두 효소의 성질을 Table 1에서 비교하였다. 두 효소는 모두 활성의 발현을 위하여 Ca²⁺을 절대적으로 요구했다. 그리고, 두 효소는 phospholipid의 의존성이 강했다. 이는 세포막의 phospholipid bilayer에 결합되어 있는 막 단백질효소의 특성으로 보여진다.

또한, 이들 효소는 다른 효소에서 보기 드문 detergent의 요구성을 강하게 보였다. 그러나 두 효소는 활성발현에서 CaM의 요구도가 전혀 달랐다. 즉, 앞서서도 언급한 바와 같이 TPase의 활성은 CaM에 무관하나, Ca²⁺-ATPase의 활성은 절대적인 CaM의 의존성이다. 그럼에도 불구하고, 이들 두 효소는 분리

Table 1. Comparison of TPase and Ca²⁺-ATPase activity on CaM binding protein(%)

	TPase	Ca ²⁺ -ATPase
complete	100	100
- Ca ²⁺	0	3
- Phospholipid	12	30
- CaM(+ TFP)	98	12
- detergent	18	48

Assay conditions were the same as described in Fig. 2. The reaction time was 30 min for TPase and 60 min for Ca²⁺-ATPase.

Phospholipid used was 5 g phosphatidyl serine and detergent used was 0.1% NP-40.

CBP에 함께 존재한다는 것은, 이들은 막에서 강한 복합체를 형성하면서 Rh.A의 정보를 세포내에 전달하는 과정에서 상보적인 역할을 하고 있음을 본 연구를 통하여 명백히 밝혀졌다.

단, TPase와 Ca²⁺-ATPase의 두 효소가 동일 단백질일 가능성을 생각할 수 있으나, 이는 이전에 Miyakawa 등의 방법(12)으로 TPase를 정제한 효소 표품으로 Ca²⁺-ATPase 활성을 측정해 본 결과 활성이 없음을 확인하였다(data는 게재하지 않았음). 이 사실로서, 두 효소는 동일 단백질이 아니면서 각각의 역할을 담당하고 있다는 것을 알 수 있었다.

요 약

이담자 효모균 *Rhodosporidium toruloides*(mating type a cell)의 성분화 과정중 세포막에 존재하면서 성 pheromone의 signal 전달에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 Ca²⁺-ATPase와 Trigger peptidase(TPase)의 상호관계를 파악하였다.

a세포 막단백질의 가용화 후 calmodulin affinity column chromatography를 이용한 calmodulin 결합 단백질을 분리하여 그 중에 Ca²⁺-ATPase와 TPase가 같이 존재하는 것을 알았다. calmodulin 결합단백질 중의 두 효소는 Ca²⁺과 phospholipid, 비이온성 detergent에 의한 활성의 의존도가 거의 동일하였다.

그러나, calmodulin에 대해서는 Ca²⁺-ATPase의 활성이 절대적으로 의존하는 반면 TPase에는 전혀 무관하였다. calmodulin에 의한 의존도가 전혀 다른 두 효소가 calmodulin 결합단백질 중에 함께 존재하는 것으로 보아 두 효소는 밀접한 복합체를 형성하여 막에 존재하는 것을 시사한다.

감사의 말

본 연구는 1990년 과학재단 연구비 지원(과제번호 KOSEF 901-1502-038-2)에 의하여 행했으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Banno, I. 1967. Studies on sexuality of *Rhodotorula*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**: 167-196.
2. Abe, K., I. Kusaka, and S. Fukui. 1975. Morphological change in the early stages of the mating of *Rhodospiridium toruloides* M1057, a strain of mating type a. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **24**: 287-290.
3. Kamiya, Y., A. Sakurai, S. Tamura, E. Tsuchiya, K. Abe, and S. Fukui. 1979. Structure of rhodotorucine A, a peptidyl factor inducing mating tube formation in *Rhodospiridium toruloides*. *Agric. Biol. Chem.* **43**: 363-369.
4. Miyakawa, T., M. Nishihara, E. Tsuchiya, and S. Fukui. 1982. Role of metabolism of the mating pheromone in sexual differentiation of the heterobasidiomycetous *Rhodospiridium toruloides*. *J. Bacteriol.* **151**: 1184-1194.
5. Miyakawa, T., H. Maruyama, E. Tsuchiya, and S. Fukui. 1982. *in vivo* and *in vitro* stimulatory effect of mating pheromone on the endogenous protein phosphorylation in *Rhodospiridium toruloides*. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 2179-2181.
6. Miyakawa, T., M. Kaji, T. Yasutake, Y.K. Jeong, E. Tsuchiya, and S. Fukui. 1985. Involvement of protein sulfhydryls in the trigger reaction of rhodotorucine A, a farnesyl peptide mating pheromone of *Rhodospiridium toruloides*. *J. Bacteriol.* **162**: 294-299.
7. Jeong, Y.K., T. Miyakawa, A. Imabayashi, E. Tsuchiya, and S. Fukui. 1987. Interaction with phospholipids of a membrane thiol peptidase that is essential for the signal transduction of mating pheromone in *Rhodospiridium toruloides*. *Eur. J. Biochem.* **169**: 511-515.
8. Miyakawa, T., T. Tachikawa, Y.K. Jeong, E. Tsuchiya, and S. Fukui. 1985. Transient increase of Ca^{2+} uptake as a signal for mating pheromone-induced differentiation in the heterobasidiomycetous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *J. Bacteriol.* **162**: 1304-1306.
9. Magline, A., and R.B. Merrifield. 1970. Chemical synthesis of peptides and proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, **39**: 841-866.
10. Kamiya, Y., A. Sakurai, S. Tamura, N. Takahashi, E. Tsuchiya, and S. Fukui. 1978. Isolation of rhodotorucine A, a peptidyl factor inducing the mating tube formation in *Rhodospiridium toruloides*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **83**: 1087-1093.
11. Miyakawa, T., T. Tachikawa, Y.K. Jeong, E. Tsuchiya, and S. Fukui. 1987. Inhibition of membrane Ca^{2+} -ATPase *in vitro* by mating pheromone in *Rhodospiridium toruloides*, a heterobasidiomycetous yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **143**: 893-900.
12. Miyakawa, T., M. Kaji, Y.K. Jeong, E. Tsuchiya, and S. Fukui. 1987. Purification and characterization of Ca^{2+} -dependent membrane peptidase involved in the signaling of mating pheromone in *Rhodospiridium toruloides*. *J. Bacteriol.* **169**: 1626-1931.

(Received November, 5, 1993)