

地中海拟无枝菌酸菌 U32 中 *amrC/amkC* 基因的序列分析及在大肠杆菌中的表达

高 瑾¹ 王伟武¹ 姜卫红^{1*} 赵国屏^{2*} 焦瑞身¹

¹(中国科学院上海植物生理研究所 微生物次生代谢分子调控开放实验室 上海 200032)

²(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

摘 要 从力复霉素 SV 产生菌——地中海拟无枝菌酸菌(*Amxolatopsis mediterranei*)U32 的硝酸盐同化基因簇的上游克隆了一个 2.6kb 的 *Eco*RI—*Xho*I DNA 片段并测定其序列。序列分析表明,该 DNA 片段编码两个完整的开放阅读框架(ORF),ORF2 的起始密码子 GTG 与 ORF1 的终止密码子 TGA 在 TG 处重叠。ORF1 编码一个含 224 个氨基酸的多肽,它同放线菌中典型的应答调节蛋白包括 AfsQ1 和 MtrA 有很高的同源性,ORF2 编码一个含 472 个氨基酸的蛋白,它同包括 AfsQ2 和 MtrB 在内的组氨酸激酶同源。ORF1 和 ORF2 有可能构成典型的双组份信号传导系统,分别命名为 *amrC* 和 *amkC*。在 T7 启动子的控制下,完整的 *amrC* 和去除子 N 端一个可能的跨膜区的 *amkC* 在大肠杆菌中分别得到了高效表达,表达蛋白的分子量分别为 30kD 和 46kD,与推测蛋白的分子量一致。

关键词 地中海拟无枝菌酸菌,双组份信号传导系统,应答调节蛋白,组氨酸激酶,序列分析

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)06-0684-06

力复霉素(Rifamycin)是一类重要的安莎类抗生素(Ansamycins)^[1],它通过与细菌的依赖 DNA 的 RNA 聚合酶相互作用,有效而专一地抑制细胞的转录^[2]。力复霉素可抑制革兰氏阳性菌,并且被广泛地应用于治疗结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)的感染。据报道,一些力复霉素的衍生物在抑制爱滋病感染者难以对付的鸟分枝杆菌(*M. avium*)和胞内分枝杆菌(*M. intracellulare*)的感染^[3],以及对付对青霉素有抗药性的肺炎球菌(*Staphylococcus pneumoniae*)的感染^[4]方面是非常有效的。有亲脂性侧链的力复霉素在高浓度下也可抑制 RNA 肿瘤病毒^[5]。本实验室多年来一直从事力复霉素 SV 产生菌——地中海拟无枝菌酸菌(*Amxolatopsis mediterranei*)U32 次生代谢的生理生化研究,发现硝酸盐对其抗生素的合成具有全局性及多效性影响^[6]。本文报道从 U32 硝酸盐还原酶同化基因簇的上游克隆并通过序列分析鉴定了一对可能的双组份信号调节蛋白的基因,并成功地将这两个基因在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中实现了高表达,为进一步研究其功能奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒和培养条件

本实验中所使用的细菌菌株、质粒见表 1。

大肠杆菌的培养基为 LB,37℃ 培养。抗生素使用浓度为:氨苄青霉素 100μg/mL,四环素 15μg/mL;地中海拟无枝菌酸菌 U32 的培养基为 NL148G^[7]无机盐培养基。

1.2 DNA 操作

地中海拟无枝菌酸菌 U32 染色体 DNA 的提取参照 Hopwood 等^[8]的《链霉菌遗传操作手册》,其它 DNA 操作如质粒的提取、酶切、去磷酸化、连接、电泳、杂交等参照 Sambrook 等的《分子克隆实验指南》^[9]。地中海拟无枝菌酸菌基因文库由彭文涛博士构建,DNA 探针用 [α -³²P]dCTP(北京亚辉公司)标记,Primer-a-Gene Kit 购自 Promega 公司,尼龙膜 HybondN+ 购自 Boehringer Mannheim 公司。洗膜条件 0.1×SSC、0.1%SDS,65℃、10min,洗涤 2 次。

1.3 DNA 序列测定和序列分析

DNA 序列测定采用 Promega T7 DNA polymerase sequencing kit,和 BioRad 公司的测序仪,部

表 1 本研究中所用到的菌株及质粒
Table 1 Bacteria Strains and Plasmids Used in This Study

Strains and plasmids	Relevant characteristics	Sources/reference
<i>E. coli</i>		
DH5α	F ⁻ Φ80dlacZDM15D(<i>lacZYA</i> ⁻ <i>argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>rk</i> ⁻ <i>mk</i> ⁺) <i>supE44λ</i> ⁻ <i>thi-1 gryA96 relA1</i>	GIBCO-BRL
XL1Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac</i> ⁻ F [<i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^a Tn10 (<i>tet</i> ^r)]	Stratagene
BL21(DE3)	<i>hsdS gal</i> (<i>λ</i> clts857 <i>ind1 sam7 nin5 lacUV5</i> -T ₇ geneI)	Novagen
<i>A. mediterranei</i>		
U-32	A high-yield producer of rifamycin SV	This lab
Plasmids		
pLAFR3	<i>cos mob</i> ⁺ <i>tra incP Tc</i> ^r	Staskawicz
pWL28	cosmid clone containing <i>A. mediterranei</i> U32 nitrate assimilation gene cluster in pLAFR3 ,Tc ^r	[6]
pBluescriptII KS(+)	pUC18-derived cloning vector ,Ap ^r	Stratagen
pBluescriptII SK(+)	pUC18-derived cloning vector ,Ap ^r	Stratagen
pL15	pBluescriptII KS(+)harboring about 2.2kb pWL28 <i>Xho</i> I fragment	This study
pL18	pBluescriptII KS(+)harboring about 4.4kb pWL28 <i>Eco</i> RI- <i>Kpn</i> I fragment	This study
pET28-a	T7 <i>lac</i> Promoter His-tag Kan ^r	Novagen
pET28-b	T7 <i>lac</i> Promoter His-tag Kan ^r	Novagen
pET28a-AmrC	pET28a harboring <i>amrC</i> gene with about 120bp nucleotides fusion (His-Tag fu-sion)	This study
pET28b-AmrC	pET28b harboring <i>amrC</i> gene without fusion. <i>amrC</i> gene direct expression vector	This study
pET28b-AmkC	pET28b harboring truncated <i>amkC</i> gene. N-terminal transmembrane region truncat-ed <i>amkC</i> gene expression vector	This study

分序列由大连宝生物公司完成。使用 BioEdit sequence Alignment Edito(Department of Microbiology ,North Carolina State University ,USA)和 Prosite , PcGene 对序列进行编辑和分析。序列同源性寻找使用 BLAST2^[10]和 FramePlot^[11]。 *amrC* 基因的 EMBL Accession number 为 AJ276898 , *amkC* 基因的 EMBL Accession number 为 AJ276899。

1.4 大肠杆菌表达载体的构建

用 *Nco*I 酶切 pET28b ,Klenow 酶补平 ;再将 pL18 用 *Sma*I 酶切回收得到的含有 *amrC* 基因的 2kb 片段与之相连 ,转化大肠杆菌 DH5α ,用 *Xho*I 酶切验证 *amrC* 的表达载体 pET28b-AmrC。用 *Hind*III 酶切 pET28a ,Klenow 补平 ,连接同样的 2kb*Sma*I 片段 ,以 *Xho*I 酶切验证 ,选择有 400bp 片段产生的克隆为 AmrC 的融合表达载体 pET28a-AmrC。 pET28b 以 *Nde*I 酶切并 Klenow 补平后 ,去磷酸化备用 ;pL15 用 *Asu*II 酶切得到含有 *amkC* 基因的 1.59kb 的 *Asu*II 片段 ,Klenow 补平后与处理好的载体相连 ,用 *Bam*HI 酶切验证 ,选择有 1.6kb 片段产生的克隆 ,为 *amkC* 基因功能区的表达载体

pET28b-AmkC。
1.5 表达
将表达载体转化 *E. coli* BL21(DE3) ,挑取单菌落至 LB 液体中 ,37℃ 过夜培养 ,按 1% 的接种量再次转接 ,37℃ 振摇约 2.5h ,*OD*_{600nm} 约 0.6~0.8 ,加入终浓度为 0.5mmol/L IPTG 诱导 3h 后收获菌体。表达产物经 10% SDS-PAGE 电泳检测表达情况。

1.6 SDS 聚丙烯凝胶电泳

参照 Schagger 和 Von Jagow^[12]的方法 ,采用 5% 的浓缩胶和 10% 的分离胶。样品制备 :菌体按 1.5 节的方法制备 ,取 1mL 的菌液 10 000 r/min 离心后 ,加入 500μL 样品缓冲液 ,悬浮菌体后沸水浴处理 5 min ,取 10μL 上样。

2 实验结果

2.1 地中海拟无枝菌酸菌 U32 硝酸盐同化基因簇 (*nas*)上游的 2.6kb *Eco*RI-*Xho*I DNA 片段含有两个完整的开放阅读框架

本实验室的前期工作已经鉴定了含有硝酸盐同化基因簇 (*nas*)的地中海拟无枝菌酸菌 U32 的

mid 基因文库克隆——pWL28 上的约 13kb 的 DNA 片段。为寻找硝酸盐同化基因簇调控区,又进一步亚克隆了距离 *nas* 上游约 1.3kb 处,长度为 2.6kb 的 *EcoRI*-*XhoI* DNA 片段(图 1),并完成其序列测定,其 GC%在 73%左右。

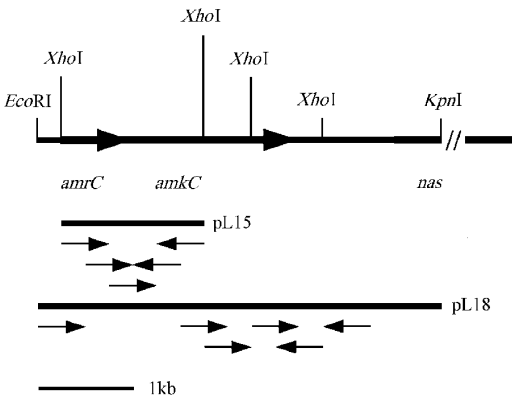


图 1 地中海拟无枝菌酸菌 U32 硝酸盐同化基因簇 (*nas*) 上游的 2.6kb *EcoRI*-*XhoI* DNA 片段的限制性酶切图谱、亚克隆及测序策略

Fig.1 Restriction map subclones and sequencing strategy of the 2.6kb *EcoRI*-*XhoI* DNA fragment from the upstream of *nas* gene cluster of *A. mediterranei* U32. Putative genes (ORFs) are illustrated by bold arrows indicating the direction of transcription. Sequencing directions and length are indicated in thin arrows.

使用 FramePlot 并结合 Blast2.0,对这一 2.6kbDNA 序列的分析结果表明,它包含两个完整的开放阅读框架(ORF)(图 1)。ORF1 起始于 126~128 位的 GTG 终止于 798~800 位的 TGA,编码一个含 224 个氨基酸、推测分子量为 24.22kD 的蛋白。在 ORF1 起始密码子 GTG 上游 6bp 处有一较典型的链霉菌 SD 序列 GGGAGG。整个基因的 GC 含量为 73.93,密码子第三位 GC 的使用频率达 96.4%。在下游紧接着 ORF1 的读框是 ORF2,它的 GTG 起始于 797~799 的核苷酸,与 ORF1 的 TGA 在 TG 处重叠,终止于 2213 位的 TGA,全长约 1419bp,编码一个含 472 个氨基酸、推测分子量为 50.06kD 的蛋白。在 ORF2 的 GTG 前没有发现 SD 序列。整个 ORF2 的 GC 含量约为 73.15%,密码子第三位 GC 使用频率为 94.9%。使用 Tmpred 软件对 ORF2 蛋白分析的结果表明,在氨基酸残基 12~32 位以及 180~199 位处有两个可能的跨膜区,并且有两种可能的跨膜取向(Table2)。在 ORF1 的 SD 序列的上游没有发现链霉菌的启动子序列(-10 和 -35 区域)也未发现类似大肠杆菌 σ^{70} 专一的

-10 和 -35 区域^[13]。

表 2 通过软件 Tmpred 预测 ORF2 存在两个可能的跨膜区模型

Table 2 Two putative models of transmembrane regions for ORF2 predicted by Tmpred^{[14]*}

STRONGLY preferred model :					
N-terminus inside 2 strong transmembrane helices ,total score 4105					
#	from	to	length	score	orientation * *
1	12	32	(21)	1794	i-o
2	180	199	(20)	2311	o-i
Alternative model :					
2 strong transmembrane helices ,total score 3587					
#	from	to	length	score	orientation
1	12	32	(21)	1801	o-i
2	180	199	(20)	1786	i-o

* Two possible models are considered and only significant TM-segments are used.

* * o indicates ' outside ', while i indicates ' inner '

2.2 氨基酸同源性比较的结果推测两个开放阅读框架可能是细菌双组份信号传导系统的一对基因

同源性比较结果表明(图 2) ORF1 编码的蛋白与天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)的应答调节蛋白 AfsQ1^[15]的同源性达 58%,ORF1 编码的蛋白的 26 位 His 残基和 50 位的 Asp 残基与 AfsQ1 的接受磷酸基团的位点对应;ORF2 编码的蛋白与天蓝色链霉菌的组氨酸激酶 AfsQ2 也有 32% 相同性,它的 270 位的 His 残基与 AfsQ2 上相应的自体磷酸化(Auto-phosphorylation)His 位点完全对应。ORF1 与 ORF2 编码的蛋白与结核分枝杆菌的一对可能的双组份调节蛋白 MtrA 和 MtrB(EMBL accession number Z95121)的相同性分别达到 49% 和 37%。ORF1 编码的蛋白与 AfsQ1 及 MtrA 三者之间也有 36% 的相同性和 39.9% 的相似性;同样,ORF2 编码的蛋白与 AfsQ2 及 MtrB 的相同性为 14.1%,相似性为 31.5%。上述序列比较的结果表明,ORF1 和 ORF2 编码的蛋白可能构成了一组双组份调节系统。由于其功能尚不明确,暂时将 ORF1 命名为 *amrC*,将 ORF2 命名为 *amkC*。其中,AmrC 可能为应答调节蛋白,而 AmkC 可能为组氨酸激酶。

2.3 地中海拟无枝菌酸菌 U32 的 *amrC*/*amkC* 基因在大肠杆菌中的表达

为了验证 DNA 测序的结果,并且为进一步研究上述基因的功能作准备,构建了 *amrC*/*amkC* 在大肠杆菌中的表达载体。最初先构建了双组份系统

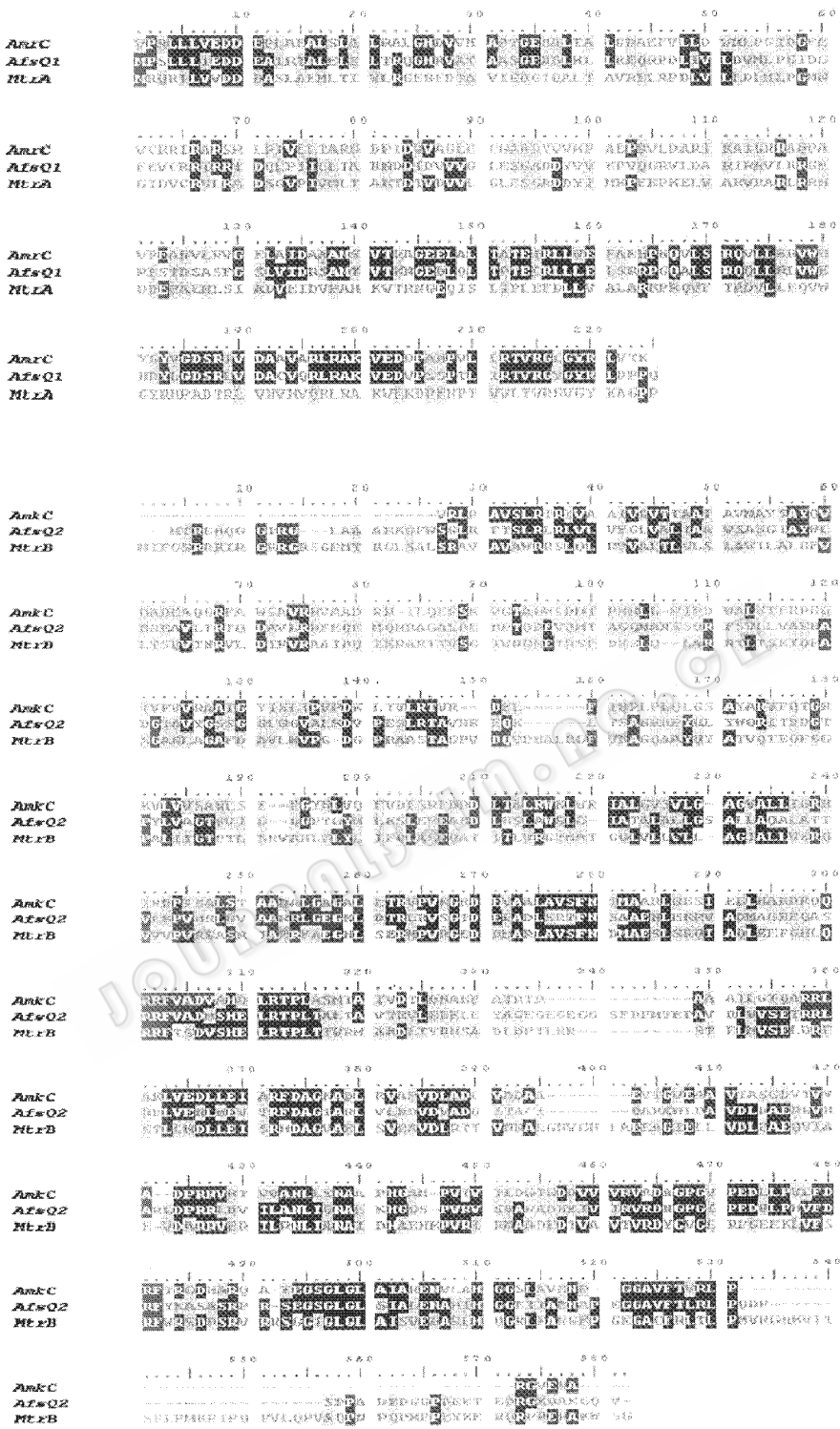


图 2 地中海拟无枝菌酸菌 U32AmrC/AmkC 与天蓝色链霉菌双组份信号传导系统 AfsQ1/AfsQ2 及结核分支杆菌可能的双组份信号传导系统 MtrA/MtrB 的氨基酸序列比较

Fig.2 An amino acid sequence alignment of AmrC/AmkC from *A. mediterranei*, AfsQ1/AfsQ2 from *S. coelicolor* and MtrA/MtrB from *M. tuberculosis*. The black shadow indicates identity while the gray shadow indicates similarity

中的应答调节蛋白,即磷酸化受体蛋白基因 *amrC* 的直接表达载体 pET28bAmrC。按常规表达条件进行诱导,结果没有表达,诱导前后的菌体生长情况

也没有明显的差异。序列测定结果表明,含 *amrC* 基因的 DNA 片段的插入、连接及读框没有错误。设想在 *amrC* 基因的 N 端连接一段引导序列,或许

能实现融合表达。因此,将含 *amrC* 基因的片段插入 pET28a 的 *Hind*III 位点,由此实现 *amrC* 基因与载体上包括 His-tag 约 40 个氨基酸的融合表达。对此表达系统进行诱导的结果,获得约 30kD 的蛋白条带(图 3),与推测的 AmrC 的分子量加上 40 个氨基酸的分子量相符。但是,表达蛋白中的大部分是以包涵体的形式出现的,仅有少量的可溶性蛋白。

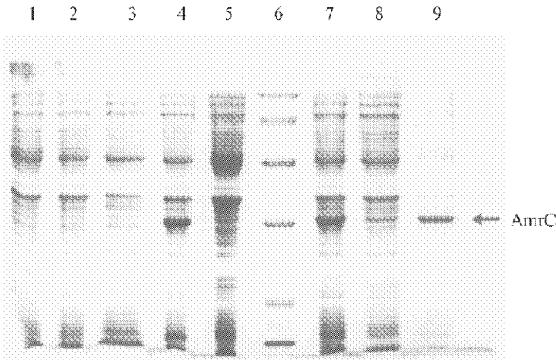


图 3 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 AmrC 在大肠杆菌中的表达

Fig.3 SDS-PAGE analysis of expression of AmrC in *E. coli*
Sample and gel preparation refer to materials and methods. 1. *E. coli* BL21(DE3) 2. *E. coli* BL21(DE3) harboring pET28a, without induction; 3. *E. coli* BL21(DE3) harboring pET28a, induced by 0.5mmol/L IPTG; 5. *E. coli* BL21(DE3) harboring pET28a AmrC, without induction; 4 and 7. *E. coli* BL21(DE3) harboring pET28aAmrC, induced by 0.5mmol/L IPTG; 6. Protein marker: 97.4kD 66.2kD 42.7kD 31.0kD 21.5kD 14.4kD; 8 and 9. Supernatant and Pellete of *E. coli* BL21(DE3) harboring pET28aAmrC, induced by 0.5mmol/L IPTG after Sonication and Centrifugation

去除 AmkC N 端的一个跨膜区,约 60 个氨基酸,保留其余部分,并将其克隆至 pET28b 载体上进行表达,结果表明有一个 46kD 左右的特异性蛋白条带表达(图 4),与剩余氨基酸推测分子量加上 N-端融合的约 20 个氨基酸的分子量之和相符。

3 讨 论

本实验从地中海拟无枝菌酸菌 U-32 硝酸盐同化基因簇的上游克隆了一个 2.6kb 的 *Eco*RI-*Xho*I DNA 片段并测定其序列。序列分析结果表明,该片段 DNA 的 GC% 含量很高,与以往我们对该菌的 DNA 测序结果一致。此序列编码两个完整的开放阅读框架(ORF),它们都以 GTG 为起始密码子,氨基酸密码第三位的 GC 使用频率在 94% 以上。ORF2 的起始密码子 GTG 与 ORF1 的终止密码子 TGA 在 TG 处重叠。

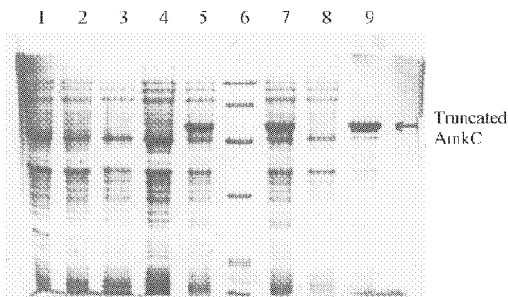


图 4 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 AmkC 在大肠杆菌中的表达

Fig.4 SDS-PAGE analysis of expression of truncated AmkC protein

Sample and gel preparation refer to materials and methods. 1. *E. coli* BL21(DE3) 2. *E. coli* BL21(DE3) harboring pET28a, without induction; 3. *E. coli* BL21(DE3) harboring pET28b, induced by 0.5mmol/L IPTG; 4. *E. coli* BL21(DE3) harboring pET28b AmkC, without induction; 5 and 7. *E. coli* BL21(DE3) harboring pET28bAmkC induced by 0.5mmol/L IPTG; 8 and 9. Supernatant and Pellete of *E. coli* BL21(DE3) harboring pET28bAmkC induced by 0.5mmol/L IPTG after sonication and centrifugation.

ORF1 编码一个含 224 个氨基酸的多肽,它同放线菌中典型的应答调节蛋白包括 AfsQ1 和 MtrA 有很高的同源性,其中,关键的 His 和 Asp 残基都与 AfsQ1 完全对应。ORF2 编码一个含 472 个氨基酸的蛋白,它同包括 AfsQ2 和 MtrB 在内的组氨酸激酶同源,其中,关键的 His 残基也与 AfsQ2 和 MtrB 完全对应。因此,ORF1 和 ORF2 有可能构成典型的双组份信号传导系统,分别命名为 *amrC* 和 *amkC*。利用计算机软件对可能的组氨酸激酶 AmkC 进行其疏水性的分析,发现其 N-端疏水性氨基酸较多,且可能有两个跨膜区域存在,而其激酶的功能区则可能集中在 C-端。

上述实验结果虽然初步鉴定了地中海拟无枝菌酸菌 U-32 的一个可能的双组份信号传导系统。但是,序列分析未能在这一可能的操纵子的上游发现明显转录的启动子(-10, -35 序列)区域;对于这两个基因的功能也尚未有实验证明。

为了进一步研究这两个蛋白的功能,我们将它们在大肠杆菌中进行表达。完整的 *amrC* 的 ORF 在 T7 启动子的控制下在大肠杆菌中不能直接表达。但是,如果将 *amrC* 的 N 端与 pET28a 上含 His-tag 的 N 端小肽融合后,则可以实现高表达。同样,去除了 N 端一个可能的跨膜区域的 *amkC* 也在大肠杆菌中得到了高效表达。上述两者表达蛋白的分子量分别为 30kD 和 46kD,与推测蛋白的分子量

一致。

大多数细菌信号传导途径是由两种蛋白组成,一种是组氨酸激酶(Histidine kinase, HK),另外一种则是应答调节蛋白(Response regulator, RR),因而该信号传导系统也被称为双组份调节系统(Two-component signal-transduction regulatory system)^[16]。原核生物细胞的代谢受到许多外界和内在因素的不断影响,细胞必须及时接受这些因素产生的信号并产生适当的、协调的反应,以求得生存,这些反应包括次生代谢产物的形成、芽胞或孢子形成等等。次生代谢的发生经常伴随着细胞的分化,暗示着信号传

导与次生代谢和菌体分化这两类复杂系统有着某种联系^[6]。对天蓝色链霉菌双组份信号传导系统 AfsQ1/AfsQ2 的研究结果表明^[15,17],它们与次级代谢密切相关。本实验室研究结果发现,硝酸盐对地中海拟无枝菌酸菌力复霉素 SV 的合成具有全局性多效性的影响。近期的研究表明^[15],硝酸盐同化基因簇对力复霉素 SV 的合成有影响;双组份信号传导系统 *amrC/amkC* 位于硝酸盐同化基因簇的上游,它们是否与硝酸盐同化有关,是否通过对硝酸协同同化基因簇来影响力复霉素的产生,还有待于进一步研究证明。

参 考 文 献

- [1] Chiao J S, Xia T H, Mei B G *et al.* Edited by Leo C Vining and Colin Stuttard, Butterworth Heinemann, Boston, 1995, pp. 447~489
- [2] Wehrli W. *Topics Curr Chem*, 1977, **72**: 21~29
- [3] Brogden R N, Fitton A. *Drugs*, 1994, **47**: 983~1009
- [4] Oppenheim B, Koornhorst H J, Austrian R. *Pediatr Infect Dis*, 1986, **5**: 520~524
- [5] Szab C, Bissel M J, Calvin M. J. *J. Virol*, 1976, **18**: 445~453
- [6] ZHAO G P, YANG Y L, Chiao Jui-Shen. Abstracts of the Xth Internat. Symposium on Biology of Actinomycetes, Beijing, 1997, p13
- [7] Schupp T, Divers M. *FEMS Microbial Lett*, 1986, **36**: 159~162
- [8] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F *et al.* Genetic Manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual. John Innes, Norwich, 1985
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989
- [10] Tatusova T A, Madden T L. *FEMS Microbial Lett*, 1999, **174**: 247~250
- [11] Ishikawa J, Hotta K. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, **174**: 251~253
- [12] Schagger H, Von Jagow G. *Anal Biochem*, 1987, **166**(2): 368~79
- [13] Strohl W R. *Nucleic Acids Res*, 1992, **20**: 961~974
- [14] Hofmann K, Stoffel W. *Biol Chem*, 1993, **347**: 166
- [15] Ishizuka H, Horinouchi S, Kieser H M *et al.* *J Bacteriol*, 1992, **174**: 7586~7594
- [16] Stock J B, Stock A M, Mottonen J M. *Nature*, 1990, **344**: 395~400
- [17] Beppu T. *TIBTECH*, 1995, **13**: 264~269

Sequence Analysis of A Putative Two-component Signal Transduction System—*amrC/amkC* Gene from *Amycolatopsis mediterranei* U32 and Their Expression in *Escherichia coli*

GAO Jin¹ WANG Wei-Wu¹ JIANG Wei-Hong¹ ZHAO Guo-Ping² CHIAO Jui-Shen¹

¹ Laboratory of Molecular Regulation for Microbiology Secondary Metabolism, Shanghai Institute of Plant Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032

² Shanghai Research Center of Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233

Abstract A 2.6kb *EcoRI-XhoI* fragment from the upstream region of the nitrate assimilatory gene cluster of rifamycin SV—producing *Amycolatopsis mediterranei* U32, was cloned and sequenced. Sequence analysis showed two complete ORFs. ORF1 and ORF2 are overlapped in the TGA of ORF1 and the GTG of ORF2. ORF1 encodes a polypeptide of 224 amino acids which displays high similarities with the typical response regulators of actinomycetes including AfsQ1 and MtrA, whereas ORF2 encodes a protein of 472 amino acids which displays homologies with the histidine kinase such as AfsQ2 and MtrB. The Two ORFs form a putative two-component signal transduction system AmrC/AmkC. Fusion expression analysis in the T7 system showed that amrC encoded a fusion protein with an apparent molecular mass of 30kD, the truncated amkC encoded a polypeptide with molecular mass of 46kD.

Key words *Amycolatopsis mediterranei*, two component signal transduction system, response regulator, histidine kinase, sequence analysis