

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 806**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/63** (2006.01)  
**C12P 21/02** (2006.01)  
**C12N 9/10** (2006.01)  
**C12N 9/48** (2006.01)  
**C12N 9/52** (2006.01)  
**C12N 15/62** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00962986 .6**  
96 Fecha de presentación: **29.09.2000**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1219713**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.07.2002**

54 Título: **PROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE TRANSGLUTAMINASA.**

30 Prioridad:  
**30.09.1999 JP 28009899**  
**28.06.2000 JP 2000194043**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.01.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.01.2012**

73 Titular/es:  
**AJINOMOTO CO., INC.**  
**15-1 KYOBASHI 1-CHOME, CHUO-KU**  
**TOKYO 104-0031, JP**

72 Inventor/es:  
**KIKUCHI, Yoshimi;**  
**DATE, Masayo;**  
**UMEZAWA, Yukiko;**  
**YOKOYAMA, Keiichi y**  
**MATSUI, Hiroshi**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 372 806 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Proceso para producción de transglutaminasa

**Antecedentes de la invención**

5 La presente invención se refiere a un proceso para producir transglutaminasa, por producción por secreción. La transglutaminasa se ha utilizado en gran escala para elaboración de alimentos, la fabricación de productos farmacéuticos y otros fines.

10 Cierta número de procesos para la producción por secreción de proteínas heterólogas han sido publicados anteriormente, con inclusión de aquéllos que se describen en la revisión de la producción por secreción de una proteína heteróloga por una bacteria perteneciente al género *Bacillus* [Microbial. Rev., 57, 109-137 (1993)], la revisión de la producción por secreción de una proteína heteróloga por la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* [Biotechnol., 11, 905-910 (1993)] y el informe acerca de la producción industrial de proteínas heterólogas por el moho perteneciente al género *Aspergillus* [Biotechnol., 6, 1419-1422 (1988); Biotechnol., 9, 976-981 (1991)].

15 La transglutaminasa producida por la producción por secreción de acuerdo con una realización de la presente invención es una enzima que cataliza la reacción de transferencia de acilo de grupos  $\gamma$ -carboxilamida en la cadena peptídica de la proteína. Cuando la enzima se hace reaccionar con una proteína, puede producirse la formación de la reticulación  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)-Lys y el reemplazamiento de Gln con Glu por desamidación. La transglutaminasa ha sido utilizada para fabricar productos alimenticios gelificados tales como gelatina, yogur, queso o productos cosméticos y otros gelificados, y para mejorar la calidad de la carne, etc (Publicación de Solicitud Japonesa Examinada No. 1-50382). Además, la transglutaminasa es una enzima que tiene alta utilidad industrial en el sentido de que se ha utilizado para fabricar materiales para microcápsulas termoestables, portadores para enzimas inmovilizadas, etc.

20 Transglutaminasas derivadas de animales y de microorganismos (transglutaminasa microbiana: a la que se hace referencia en lo sucesivo como 'MTG') se han dado a conocer con anterioridad. La primera es la enzima dependiente del ion calcio que está distribuida en órganos animales, piel, sangre, etc. Los ejemplos incluyen transglutaminasa hepática de cobayo (K. Ikura et al. Biochemistry 27, 2898 (1988)), transglutaminasa de queratinocitos epidérmicos humanos (M.A. Phillips et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 9333 (1990)), factor XIII de coagulación de la sangre humana (A. Ichinose et al. Biochemistry 25, 6900 (1990)) y otros.

25 En cuanto a la última, se han descubierto transglutaminasas independientes del calcio a partir de bacterias pertenecientes al género *Streptovorticillium*, que incluye, por ejemplo, *Streptovorticillium griseocarneum* IFO12776, *Streptovorticillium cinnamoneum* sub sp. *cinnamoneum* (éste puede abreviarse en lo sucesivo como *S. cinnamoneum*) IFO12852, *Streptovorticillium mobaraense* (éste puede abreviarse en lo sucesivo como *S. mobaraense*) IFO13819 y otras (Publicación de Solicitud de Patente Japonesa No Examinada (JP-Kokai) No. 64-27471). El mapeado de los péptidos y el análisis estructural de los genes han revelado que la estructura primaria de la transglutaminasa producida por estos microorganismos no compartía homología alguna con las transglutaminasas de animales (Solicitud de Patente Europea No. 0481 504 A1).

30 Dado que la transglutaminasa derivada de microorganismos (MTG) se produce por la purificación de los cultivos de microorganismos tal como se ha descrito arriba, ha habido problemas en términos de cantidad y eficiencia y factores análogos. Se ha intentado también la producción de transglutaminasa utilizando un procedimiento de ingeniería genética. Proteínas transglutaminasa y los genes de las mismas se han publicado, por ejemplo, en Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 82-87(1994), Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 88-92(1994), Biochimie, 80, 313-319(1998), Eur. J. Biochem, 257, 570-576(1998), WO 96/06931, WO 96/22366, etc , que informan de la expresión y producción de transglutaminasa en sistemas hospedador-vector tales como *Streptomyces lividans*, *Aspergillus oryzae* y *Escherichia coli*. Además de esta información, se ha publicado un proceso en el cual se produce transglutaminasa por producción por secreción en microorganismos tales como *E. coli* y levadura (JP-Kokai No. 5-199883) y un método en el cual se produce MTG que posee actividades por expresión de MTG como una proteína fusionada inactiva en un cuerpo de inclusión dentro de *E. coli* y solubilización subsiguiente del cuerpo de inclusión utilizando agentes desnaturizantes de proteínas, y reconstitución subsiguiente de la misma por eliminación de los agentes desnaturizantes (JP-Kokai No. 6-30771). Sin embargo, se ha indicado el problema de que el nivel de expresión es significativamente bajo en la producción por secreción por microorganismos tales como *E. coli* o levadura.

35 Por otra parte, existen ejemplos de estudios previos para la producción por secreción eficiente de proteínas heterólogas utilizando una bacteria corineforme, que incluyen la secreción de nucleasas y lipasas [US4965197, J. Bacteriol., 174, 1854-1861 (1992)] y la secreción de proteasas tales como subtilisina [Appl. Environ. Microbiol., 61, 1610-1613 (1995)] por *Corynebacterium glutamicum* (éste puede abreviarse en lo sucesivo como *C. glutamicum*), un estudio acerca de la secreción de proteínas de la superficie celular de una bacteria corineforme [Solicitud de Patente Internacional Japonesa Publicada No. Hei 6-502548], la secreción de proteína de fijación de fibronectina utilizando este estudio [Appl. Environ. Microbiol., 63, 4392-4400 (1997)], un informe en el cual la secreción de proteínas se mejoró utilizando una maquinaria secretora mutada [JP-Kokai No. 11-169162], etc., pero ha habido un número reducido de informes acerca de proteínas limitadas. Teniendo en cuenta la cantidad acumulada de proteínas, Appl. Environ. Microbiol., 61, 1610-1613 (1995) describe que se acumulaban aproximadamente 2,5 mg/ml de proteína por

expresión del gen de proteasa alcalina de *Dichelobacter nodosus* en *C. glutamicum* utilizando un promotor del gen de subtilisina (*aprE*) de *Bacillus subtilis*, sitio de fijación de ribosoma y la secuencia de un péptido señal, pero US 4965197, JP-Kokai No. 6-502548 o JP-Kokai No. 11-169182 no describen específicamente los valores de la cantidad de las proteínas secretadas y acumuladas. Adicionalmente, en el caso de la proteína de fijación de fibronectina [Appl. Environ. Microbiol., 63, 4392-4400 (1997)], únicamente se ha confirmado la acumulación secretora de la proteína de aproximadamente 2,5 µg/l. Así pues, no ha habido informe alguno acerca de que pudieran acumularse eficientemente proteínas heterólogas en el medio a un nivel práctico.

Adicionalmente, se ha desarrollado una tecnología de ingeniería genética para una bacteria corineforme en un sistema que utiliza plásmido y fago, tal como el establecimiento de la transformación por protoplastos [J. Bacteriol., 159, 306-311 (1984); J. Bacteriol., 161, 463-467 (1985)], el desarrollo de un tipo diverso de vectores [Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903(1984); J. Bacteriol., 159, 306-311(1984); J. Gen. Microbiol., 130, 2237-2246(1984); Gene, 47, 301-306(1986); Appl. Microbiol. Biotechnol., 31, 65-69(1989)], el desarrollo del método de regulación de expresión génica [Bio/Technology, 6, 428-430 (1988)] y el desarrollo de cósmidos [Gene, 39, 281-286 (1985)]. Además, existen informes acerca de la clonación de genes a partir de una bacteria corineforme [Nucleic Acids Res., 14, 10113-1011(1986); J. Bacteriol., 167, 695-702(1986); Nucleic Acids Res., 15, 10598(1987); Nucleic Acids Res., 15, 3922(1987); Nucleic Acids Res., 16, 9859(1988); Agric. Biol. Chem., 52, 525-531(1988); Mol. Microbiol., 2, 63-72(1988); Mol. Gen. Genet., 218, 330-339(1989); Gene, 77, 237-251(1989)].

Adicionalmente, se ha publicado también un elemento transponible derivado de una bacteria corineforme [WO93/18151; EP0445385; JP-Kokai No. 6-46867; Mol. Microbiol., 11, 739-746(1994); Mol. Microbiol., 14, 571-581(1994); Mol. Gen. Genet., 245, 397-405(1994); FEMS Microbiol. Lett., 126, 1-6(1995); JP-Kokai No. 7-107976].

El elemento transponible se refiere a un fragmento de DNA que puede transponerse en el cromosoma y se sabe que está presente en una extensa gama de organismos que van desde procariotas a eucariotas. Se han desarrollado transposones que utilizan elementos transponibles [WO 93/18151; JP-Kokai No. 7-107976; Mol. Gen. Genet., 245, 397-405 (1994); JP-Kokai No. 9-70291] y ha llegado a estar disponible un gen heterólogo que se expresa utilizando un transposón.

### Sumario de la invención

Un objeto de la invención es proporcionar un proceso para la producción de transglutaminasa haciendo que una bacteria corineforme produzca transglutaminasa y liberando de modo eficiente el producto extracelularmente (es decir, por producción por secreción).

Los autores de la invención han encontrado un proceso para la producción por secreción eficaz de transglutaminasa, teniendo en cuenta el hecho de que una pro-parte así como un péptido señal en una proteína secretora de actinomicetos y análogos juegan un papel importante en el proceso de secreción.

Por consiguiente, la presente invención es un proceso para producir transglutaminasa caracterizado porque una proteína de fusión se produce y se secreta (secreto-producción) en una bacteria corineforme, en donde la transglutaminasa contiene su pro-parte ligada al lado de aguas abajo del dominio del péptido señal de una bacteria corineforme y después de ello se escinde y se elimina la pro-parte.

Más específicamente, la invención es un proceso para obtener una gran cantidad de transglutaminasa por transferencia de un constructo genético de expresión en una bacteria corineforme, en donde una secuencia génica de una proteína deseada que contiene una parte pro-estructural, en particular, la secuencia del gen de pro-transglutaminasa, que está ligada al lado de aguas abajo de una secuencia codificante del dominio del péptido señal de una bacteria corineforme, especialmente el dominio del péptido señal de una proteína de la superficie celular, cultivo de la bacteria corineforme así transformada, liberación extracelularmente eficiente de la proteína resultante y tratamiento de la proteína que se libera fuera de las células con una proteasa, etc. para escindir la pro-parte.

La invención es también un proceso para obtener transglutaminasa en el cual la parte pro-estructural de pro-transglutaminasa se escinde, en donde se generan también un constructo de expresión para proteasa y análogos del mismo modo que en el caso del constructo genético para transglutaminasa, introduciendo el mismo en una bacteria corineforme junto con el constructo de expresión que contiene el gen de pro-transglutaminasa y cultivando la bacteria corineforme así transformada, o introduciendo el constructo de expresión para la proteasa y análogos en otra bacteria corineforme, y cultivando la bacteria corineforme transformada junto con la bacteria introducida por el gen de pro-transglutaminasa, para expresar y secretar la pro-transglutaminasa y la proteasa.

Como se utiliza en esta memoria, "la secreción" de una proteína o péptido hace referencia al transporte de la molécula de proteína o péptido fuera de la célula bacteriana (transporte extracelular) incluyendo el caso en que la molécula de la proteína o del péptido existen finalmente en forma completamente libre en el medio así como el caso en que únicamente la parte de la molécula de proteína o péptido está presente fuera de la célula y el caso en que las mismas están localizadas en la superficie de la célula.

### Modo Óptimo para Realización de la Invención

De acuerdo con el proceso de la invención, se utiliza una bacteria corineforme como sistema vector hospedador, y puede obtenerse una gran cantidad de transglutaminasa, de la cual se ha eliminado la parte pro-estructural, por generación de un constructo de expresión en el cual un gen de transglutaminasa que contiene una parte pro-estructural en forma secretora está ligado al lado de aguas abajo del péptido señal de la proteína de la superficie celular de una bacteria corineforme, introducción y expresión del constructo en una bacteria corineforme y tratamiento de la parte pro-estructural de la pro-transglutaminasa secretada extracelularmente con una proteasa y análogos para escindir la parte pro-estructural.

De acuerdo con el proceso de la presente invención, puede obtenerse directamente por vía extracelular una transglutaminasa en la cual está escindida la pro-parte por generación de un constructo genético de expresión para una proteasa y análogos de manera similar al constructo genético de pro-transglutaminasa, introducción y expresión del mismo en la bacteria corineforme junto con el constructo genético de pro-transglutaminasa y cultivo de la bacteria corineforme así transformada, o introducción del constructo genético de expresión para la proteasa y análogos en otra bacteria corineforme, y cultivo de la bacteria corineforme así transformada junto con la bacteria en la cual se ha introducido pro-transglutaminasa, logrando así que la bacteria exprese y secrete la pro-transglutaminasa y la proteasa.

Es de conocimiento general que una proteína secretora se traduce como un prepéptido o prepropéptido y se convierte después de ello en una proteína madura. Es decir, se sabe que, en general, la misma se traduce como un péptido o prepropéptido, después de lo cual se escinde el péptido señal ("una pre-parte"), con lo cual aquélla se convierte en un péptido o propéptido maduro por escisión ulterior de la pro-parte con una proteasa. Como se utiliza en esta memoria, "una secuencia señal" hace referencia a la secuencia que está localizada en el terminal N de un precursor de proteína secretora y que no está presente en una proteína madura existente naturalmente, y "un péptido señal" hace referencia al péptido que se escinde de dicha proteína precursora. Generalmente, una secuencia señal se escinde acoplado la secreción extracelular por una proteasa (a la que se hace referencia generalmente como peptidasa señal). Aunque un péptido señal de este tipo comparte ciertas características comunes en la secuencia en diversas especies, un péptido señal que tiene función secretora en una especie no tiene necesariamente la misma función secretora en otra especie.

Como se utiliza en esta memoria, una proteína que contiene a la vez un péptido señal y una pro-parte, es decir, un producto de traducción primario puede denominarse "una preproteína", y una proteína que no contiene un péptido señal pero contiene una pro-parte puede denominarse "una proproteína". Una pro-parte de una proproteína puede denominarse "una parte pro-estructural" o "una pro-estructura". Una "parte proestructural/pro-estructura" de una proteína puede utilizarse intercambiabilmente en esta memoria con "una pro-parte" de una proteína. Un péptido señal en una preproteína o proproteína puede derivarse de una proteína diferente o ser un péptido señal existente naturalmente en la proteína deseada y el mismo se deriva preferiblemente de una proteína secretora del hospedador a utilizar. Alternativamente, el mismo puede modificarse para tener el codón óptimo dependiendo del uso de codones del hospedador a utilizar. Además, el péptido señal que puede utilizarse para el propósito de la invención puede contener una parte de la secuencia de aminoácidos del terminal N de una proteína madura existente naturalmente de la cual se deriva el péptido señal. Una preproteína puede designarse especialmente "una preproteína fusionado heterológamente" cuando el péptido señal se deriva de la proteína diferente. Por ejemplo, cuando una proteína es transglutaminasa, las mismas se denominan "preprotransglutaminasa", "protransglutaminasa" y "preprotransglutaminasa fusionado heterológamente", respectivamente. Una proteína en la cual "la pro-parte está escindida" hace referencia a una proteína en la cual al menos uno o más aminoácidos que constituyen la pro-parte se ha eliminado por escisión del enlace peptídico, con inclusión de una proteína que tiene un aminoácido del terminal N idéntico al de la proteína existente naturalmente e incluye también una proteína que tiene uno o más aminoácidos adicionales en el terminal N que se derivan de la pro-parte comparada con la proteína existente naturalmente, y una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos más corta que la de una proteína madura existente naturalmente, con tal que la proteína tenga una actividad de la proteína deseada.

Como se describe en la técnica anterior, se han presentado un número limitado de informes en los cuales se ha conseguido la producción por secreción extracelular de una proteína heteróloga utilizando bacterias corineformes y el proceso de producción por secreción no se ha completado técnicamente. Asimismo, no se sabe que una bacteria corineforme secrete extracelularmente una proteína tal como una proteasa por sí misma. Los ejemplos conocidos son DNasa endógena [US 4965197] y los hechos de que la proteína de la superficie celular utilizada en la presente invención cae fuera de la superficie celular para encontrarse fuera de la célula [JP-Kokai No. 6-502548]. Sin embargo, cualquier péptido señal que esté implicado en la secreción de una proteína o bacteria corineforme no se ha dado a conocer con anterioridad excepto para las proteínas de la superficie celular. Las únicas proteínas conocidas de la superficie celular de corinebacterias, hasta la fecha, son genes para PS1 y PS2, las proteínas de la superficie celular de *Corynebacterium glutamicum* [JP-Kokai No. 6-502548], y el gen para SlpA, la proteína de la superficie celular de *Corynebacterium ammoniagenes* [que puede abreviarse en lo sucesivo como *C. ammoniagenes*] [JP-Kokai No. 10-108675]. Entre estas proteínas, PS1 y SlpA comparten cierta homología (aproximadamente 30%), pero prácticamente no se encontró homología alguna entre otros, y adicionalmente no se ha encontrado homología alguna en el dominio de la secuencia señal entre unos y otros. Como ejemplos de secuencias señal, las secuencias señal de PS1 y

PS2 de *Corynebacterium glutamicum* se muestran en SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 1, y la secuencia señal de SlpA de *Corynebacterium ammoniagenes* se muestra en SEQ ID NO: 2.

Por esta razón, los inventores clonaron el gen para la proteína PS2 de la cepa de *C. glutamicum* [anteriormente, *Brevibacterium lactofermentum*] ATCC13869 y determinaron la secuencia. Se encontró que no había diferencia alguna en el dominio de la secuencia señal respecto a la secuencia conocida de *C. glutamicum*, pero que había dos aminoácidos diferentes en la secuencia hasta el residuo del aminoácido trigésimo octavo del terminal N de la proteína madura de la superficie celular (residuo Asn en lugar de Thr en la posición 40 y residuo Glu en lugar de Gly en la posición 35 en la secuencia de aminoácidos, como se muestra en SEQ ID NO: 7). La secuencia de nucleótidos codificante de 68 residuos que comprenden 30 residuos de aminoácidos del péptido señal y 38 residuos de aminoácidos del terminal N de la proteína madura de la superficie celular y su región aguas arriba de 5' que contiene un dominio promotor se muestra en SEQ ID NO: 6 y la secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 7.

A continuación, el inventor examinó la secreción de una proteína heteróloga utilizando la región que contenía el dominio promotor o el dominio del péptido señal de la proteína de la superficie celular a fin de determinar si puede conseguirse la producción por secreción extracelular de una gran cantidad de la proteína heteróloga en una bacteria corineforme.

Dado que el gen de transglutaminasa de los actinomicetos tiene un contenido elevado de GC y el gen de la bacteria corineforme tiene un contenido de GC próximo al de los actinomicetos y ambos tienen también un uso de codones muy similar, existe la ventaja de que puede utilizarse directamente el gen de los actinomicetos. Por esta razón, el inventor investigó si puede utilizarse directamente un gen de transglutaminasa de actinomicetos y encontró que el péptido señal de transglutaminasa de los actinomicetos no funcionaba satisfactoriamente en una bacteria corineforme. Sin embargo, se ha descubierto que el gen de transglutaminasa codificante de la proteína madura que contiene la parte pro-estructural de los actinomicetos fusionada con el péptido señal de la proteína de la superficie celular de una bacteria corineforme funcionada eficazmente sin modificación alguna y era secretado eficientemente fuera de la célula como una proproteína que contenía la parte pro-estructural. Cuando se utilizó el gen para transglutaminasa con la parte pro-estructural que comprende adicionalmente 30 residuos de aminoácidos de la proteína de la superficie celular y 38 residuos de aminoácidos del dominio del terminal N de la proteína madura de la superficie celular, es decir, el gen para transglutaminasa fusionado con el dominio del terminal N de la proteína madura de la superficie celular, aumentó adicionalmente la eficiencia de la secreción extracelular de transglutaminasa.

Como se utiliza en esta memoria, una bacteria corineforme es un bacilo Gram-positivo aerobio, que incluye bacterias que se clasificaban anteriormente como *Brevibacterium* pero que se han unificado actualmente como *Corynebacterium* (Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1981)) con inclusión de *Brevibacterium* que está estrechamente relacionado con *Corynebacterium*. Una ventaja del uso de *Corynebacterium* es que el mismo secreta inherentemente una cantidad mucho menor de proteínas fuera de la célula comparado con mohos, levaduras o bacterias pertenecientes a *Bacillus* que han sido adecuadas previamente para efectuar la secreción de una proteína heteróloga, que permiten que el proceso de purificación del producto se simplifique y se acorte cuando se realiza la producción por secreción de una proteína heteróloga, y que ello es excelente en términos de su coste medio, el procedimiento de cultivo y el rendimiento, dado que se desarrolla satisfactoriamente en un medio de cultivo simple tal como los compuestos de amoníaco, sales inorgánicas, etcétera.

Ejemplos de *Corynebacterium* que pueden utilizarse como bacteria hospedadora en la presente invención incluyen cepas de tipo salvaje que incluyen *Brevibacterium saccharolyticum* ATCC 14066, *Brevibacterium immariophilum* ATCC 14068, *Brevibacterium lactofermentum* (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13869, *Brevibacterium roseum* ATCC 13825, *Brevibacterium flavum* (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 14067, *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC 13870, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Corynebacterium lilium* (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 15990, *Brevibacterium ammoniagenes* (*Corynebacterium ammoniagenes*) ATCC 6871, y cepas mutantes derivadas de estas cepas de tipo salvaje, por ejemplo, cepas mutantes deficientes en la capacidad de producir glutamato, cepas mutantes para producción de aminoácidos tales como lisina y análogos, y cepas mutantes modificadas para producir otras sustancias tales como ácidos nucleicos, por ejemplo, inosina.

El constructo genético que puede utilizarse en la presente invención incluye generalmente un promotor, una secuencia codificante de un péptido señal apropiado y una fracción de ácido nucleico codificante de una proteína deseada, y una secuencia reguladora (un operador o terminador, etc.) necesaria para expresar el gen de la proteína deseada en una bacteria corineforme, en una posición apropiada tal que los mismos puedan funcionar. La proteína deseada puede tener una parte pro-estructural en el terminal N. Vectores que pueden utilizarse para este constructo no están limitados particularmente, e incluyen uno cualquiera que pueda funcionar en una bacteria corineforme, y pueden ser aquéllos que se multiplican autónomamente tales como plásmidos o vectores que están integrados en el cromosoma de la bacteria. Son particularmente preferibles plásmidos derivados de bacterias corineformes. Éstos incluyen, por ejemplo, pHM1519 (Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903 (1984)), pAM330 (Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903(1984)), y plásmidos obtenidos por modificación de los mismos, que poseen genes farmacorresistentes. Pueden utilizarse también transposones artificiales y análogos. Cuando se utiliza un transposón, el gen deseado se introduce en el cromosoma por recombinación homóloga o por su propia capacidad de transposición.

Los promotores que pueden utilizarse en la invención no están limitados particularmente. Por regla general puede utilizarse cualquier promotor que pueda funcionar en la célula de una bacteria corineforme. El mismo puede ser también un promotor derivado de una especie diferente, por ejemplo, un promotor derivado de *E. coli*, tal como el promotor *tac*. Entre estos promotores, es más preferible un promotor potente, tal como el promotor *tac*, etc. Ejemplos de promotores derivados de una bacteria corineforme incluyen promotores para los genes de las proteínas de la superficie celular PS1, PS2 y SlpA, promotores para los genes en sistemas biosintéticos de aminoácidos diferentes, por ejemplo, el gen de glutamato-deshidrogenasa en el sistema de biosíntesis del ácido glutámico, el gen de glutamina-sintetasa en el sistema de síntesis de la glutamina, el gen de aspartoquinasa en el sistema de biosíntesis de lisina, el gen de homoserina-deshidrogenasa en el sistema de biosíntesis de treonina, el gen de acetohidroxiato-sintasa en el sistema de biosíntesis de isoleucina y valina, el gen de 2-isopropilmalato-sintasa, el gen de glutamato-quinasa en el sistema de síntesis de prolina y arginina, el gen de fosforribosil-ATP-pirofosforilasa en el sistema de síntesis de la histidina, el gen de ácido desoxiarabinohepturónico-fosfato (DAHP)-sintasa en el sistema de biosíntesis de aminoácidos aromáticos tales como triptófano, tirosina y fenilalanina, etc., el gen de fosforribosilpirofosfato (PRPP)-amidotransferasa, el gen de inosinato-deshidrogenasa y el gen de guanilato-sintasa en el sistema de biosíntesis de ácidos nucleicos tales como inosinato y guanilato.

El péptido señal que se utiliza en la presente invención es el péptido señal de una proteína secretora del hospedador, *Coryneform bacterium*, y preferiblemente es el péptido señal de una proteína de la superficie celular de una bacteria corineforme. Las proteínas de la superficie celular incluyen PS1 y PS2 derivadas de *C. glutamicum* (JP-Kokai No. 6-502548), y SlpA derivada de *C. ammoniagenes* (JP-Kokai No. 10-108675). La secuencia de aminoácidos de PS1 se muestra en SEQ ID NO: 29, la secuencia de aminoácidos de PS2 en SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de SlpA en SEQ ID NO: 2. Adicionalmente, se ha informado que la DNasa de una bacteria corineforme tiene también un péptido señal, como se describe en la patente U.S. No. 4965597, que puede utilizarse en la presente invención.

Al péptido señal puede estar conectada una porción de la secuencia del terminal N de aminoácidos de la proteína secretora de la que se deriva el péptido señal. La secuencia señal es escindida por una peptidasa señal mientras que el producto traducido se secreta extracelularmente. Además, el gen codificante del péptido señal puede utilizarse en forma nativa o en forma modificada para contener los codones óptimos dependiendo del uso de codones en el hospedador a utilizar.

Cuando se utilizan estos péptidos señal, los genes que codifican las proteínas deseadas se ligan al terminal 3' de los genes que codifican los péptidos señal y se localizan de tal modo que los mismos están sometidos a la regulación de expresiones por los promotores arriba descritos.

Las proteínas útiles que pueden producirse por secreción de acuerdo con la presente invención incluyen esencialmente, pero sin carácter limitante, la totalidad de las proteínas secretoras derivadas de animales y plantas y microorganismos. Por ejemplo, pueden producirse por secreción de acuerdo con la presente invención proteínas tales como proteasa, aminopeptidasa, carboxipeptidasa, colagenasa y quitinasa. Las proteínas que se preparan por la producción por secreción de acuerdo con la presente invención son preferiblemente proteínas secretoras existentes naturalmente, más preferiblemente proteínas que tienen partes pro-estructurales adicionales. Se prefiere particularmente transglutaminasa como una proteína útil preparada por la producción por secreción de acuerdo con la presente invención. Como genes de transglutaminasa, por ejemplo, se pueden utilizar genes para transglutaminasa secretora derivada de actinomicetos, por ejemplo, *S. mobaraense* IFO13819, *S. cinnamoneum* IFO12852, *Streptovorticillium griseocarneum* IFO12776, *Streptomyces lydicus* [WO 9606931], etc, y mohos tales como Oomicetos [WO9622366], para el propósito de la presente invención. Los genes que codifican estas proteínas pueden modificarse dependiendo del tipo del hospedador a utilizar y con objeto de conseguir la actividad deseada, y comprenden la adición, delección, reemplazamiento de uno o más residuos de aminoácidos y opcionalmente pueden convertirse en el codón óptimo dependiendo de la secuencia de uso de codones en el hospedador.

Cuando la proteína preparada por la producción por secreción de acuerdo con la presente invención es la proteína expresada naturalmente como un prepropeptido, se utiliza preferiblemente el fragmento de gen codificante de la proproteína que contiene la parte pro-estructural (pro-parte). Como ejemplos de las secuencias de las pro-partes, las secuencias de las partes pro-estructurales de transglutaminasas derivadas de actinomicetos se muestran en SEQ ID NO: 3 (derivada de *S. mobaraense*) y SEQ ID NO: 4 (derivada de *S. cinnamoneum*). La pro-parte de la proteína puede ser escindida por medios apropiados, por ejemplo, proteasas. Puede utilizarse una aminopeptidasa, una endopeptidasa que escinde la misma en una posición apropiada, o una proteasa más específica. Preferiblemente, las proteasas que escinden la proteína de tal modo que la proteína resultante tiene una actividad equivalente o mayor que la de la proteína existente naturalmente. Alternativamente, la secuencia génica codificante de la proteína deseada o la parte pro-estructural de la proteína deseada puede modificarse también y diseñarse para expresar la proteína que tiene el sitio de reconocimiento para una proteasa específica para la localización deseada. Procedimientos generales de biotecnología molecular que incluyen dichas técnicas de modificación, técnicas de clonación de genes y técnicas de detección para las proteínas producidas son bien conocidos por las personas expertas en la técnica, pudiendo hacerse referencia a Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition* (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, *DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II* (D. N. Glover ed. 1985), F.M. Ausubel et al.(eds), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley

& Sons, Inc. (1994), PCR Technology: Principles and Application for DNA Amplification, H. Erlich, ed., Stockton Press and etc.

Ejemplos de partes pro-estructurales que tienen las partes pro-estructurales modificadas que se muestran en SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 incluyen las partes pro-estructurales modificadas que se describen en SEQ ID NO: 30 a SEQ ID NO: 38.

Textos libres de la lista de secuencias

SEQ ID NO: 30 a SEQ ID NO: 37: la parte pro-estructural modificada de transglutaminasa de *S. mobaraense*

SEQ ID NO: 38: la quimera de las partes pro-estructurales de transglutaminasa de *S. mobaraense* y *S. cinnamoneum*

Estas partes pro-estructurales modificadas tienen las características siguientes:

SEQ ID NO: 30 = AP en el terminal C de la parte pro-estructural de *S. mobaraense* (45 residuos de aminoácidos) está deletado;

SEQ ID NO: 31 = FRAP en el terminal C de la parte pro-estructural de *S. mobaraense* (45 residuos de aminoácidos) está deletado;

SEQ ID NO: 32 = D en el terminal N de la parte pro-estructural de *S. mobaraense* (45 residuos de aminoácidos) está deletado;

SEQ ID NO: 33 = DNGAGE en el terminal N de la parte pro-estructural de *S. mobaraense* (45 residuos de aminoácidos) está deletado;

SEQ ID NO: 34 = RAP en el terminal C de la parte pro-estructural de *S. mobaraense* (45 residuos de aminoácidos) está modificado a GPK;

SEQ ID NO: 35 = RAP en el terminal C de la parte pro-estructural de *S. mobaraense* (45 residuos de aminoácidos) está modificado a GPR;

SEQ ID NO: 36 = GPSFRAP en el terminal C de la parte pro-estructural de *S. mobaraense* (45 residuos de aminoácidos) está modificado a GPK (FRAP se ha deletado y S en el terminal C se ha modificado a K);

SEQ ID NO: 37 = GPSFRAP en el terminal C de la parte pro-estructural de *S. mobaraense* (45 residuos de aminoácidos) está modificado a GPR (FRAP se ha deletado y S en el terminal C se ha modificado a S);

SEQ ID NO: 38 = la parte quimérica pro-estructural (56 residuos de aminoácidos) constituida por las partes pro-estructurales parciales de *S. mobaraense* (15 residuos de aminoácidos) y las partes pro-estructurales parciales de *S. cinnamoneum* (41 residuos de aminoácidos).

Así pues, la parte pro-estructural puede tener reemplazamiento, delección, inserción o adición de uno o más aminoácidos con tal que la misma tenga el sitio de reconocimiento específico para la proteasa en la posición dada.

La región del terminal N de la proteína generada por degradación de la proteasa puede no ser necesariamente idéntica a la de la proteína existente naturalmente, y uno o varios aminoácidos pueden añadirse adicionalmente a o deletarse de la proteína existente naturalmente.

Generalmente se prefiere que la proteína resultante se escinda en la misma posición apropiada que la de una proteína existente naturalmente en términos de su actividad, y es más preferido que la misma sea idéntica al péptido maduro de una proteína existente naturalmente. Por ejemplo, las secuencias de transglutaminasas maduras de *S. mobaraense* y *S. cinnamoneum* se muestran en SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 43, respectivamente. Por tanto, las proteasas específicas que escinden el propéptido en la posición tal que el mismo genera la misma proteína que la proteína madura existente naturalmente son generalmente muy preferibles. Sin embargo, para un objetivo particular los péptidos que tienen una secuencia más larga o más corta de residuos de aminoácidos en uno a varios residuos en el terminal N con relación a la de una proteína existente naturalmente pueden poseer actividad más apropiada. Tales proteasas incluyen, por ejemplo, Dispasa (disponible de Boehringer Mannheim Co.) que puede estar disponible comercialmente y proteasas obtenidas a partir del medio de cultivo de microorganismos, tal como, por ejemplo, el medio de cultivo de actinomicetos. Dichas proteasas pueden utilizarse en un estado sin purificar u, opcionalmente, pueden utilizarse después de purificación hasta la pureza apropiada.

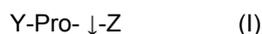
Un ejemplo de otra proteasa adecuada es SAMP45, una serina-proteasa producida por *Streptomyces albogriseolus* (éste puede abreviarse en lo sucesivo como *S. albogriseolus*). En el caso de la protransglutaminasa de *S. mobaraense*, dado que SAMP45 escinde predominantemente entre Ser en la posición 41 y Phe en la posición 42 de la parte pro-estructural como se define en SEQ ID NO: 3, se genera la proteína que tiene la estructura en la cual los cuatro aminoácidos adicionales de Phe-Arg-Ala-Pro del terminal C para la parte pro-estructural se añaden al terminal N de

la transglutaminasa madura existente naturalmente que se muestra en SEQ ID NO: 5. Los autores de la presente invención confirmaron que estas proteínas tenían también las actividades de transglutaminasa. La secuencia del gen SAMP45 ha sido ya determinada y la secuencia de aminoácidos de la proteína con la parte pro-estructural adicional (proSAMP45) se muestra en SEQ ID NO: 39 (J. Bacteriol., 179, 430-438 (1997)), asimismo. Cuando se deja actuar SAMP45 sobre la protransglutaminasa en la forma del medio de cultivo de *S. albogriseolus* o en la forma de la célula *S. albogriseolus*, el mismo puede escindir la parte pro-estructural dejando restante una parte del mismo, lo que da como resultado una transglutaminasa en la cual se ha eliminado prácticamente la totalidad de la parte pro-estructural. Alternativamente, la transglutaminasa en la cual se ha eliminado una gran parte de la parte pro-estructural puede obtenerse análogamente por co-cultivo de una bacteria corineforme en la cual se ha introducido el gen preproSAMP45 con una bacteria corineforme que produce pro-transglutaminasa por secreción.

Adicionalmente, la activación de la transglutaminasa por la escisión de la parte pro-estructural puede realizarse eficientemente introduciendo de modo similar el gen SAMP45 en la bacteria corineforme en la cual se ha introducido el gen de preprotransglutaminasa y dejando que se produzca simultáneamente por secreción el SAMP45 así como la protransglutaminasa.

Además, puede obtenerse transglutaminasa madura idéntica a la transglutaminasa existente naturalmente utilizando la peptidasa prolina-específica producida por *S. mobaraense* (svPEP), que ha sido encontrada por los inventores, combinada con SAMP45, lo que da como resultado la eliminación de los 4 aminoácidos Phe-Arg-Ala-Pro añadidos en el terminal N.

Esta svPep es una enzima que escinde específicamente los péptidos o los análogos peptídicos representados por la fórmula (I) siguiente en el sitio que se muestra con  $\downarrow$  en la fórmula, es decir, en el lado del terminal carboxilo del tercer o cuarto residuo prolina desde el terminal N:



en donde Y representa un oligopéptido constituido por dos o tres residuos de aminoácido y Z representa un aminoácido, péptido, amida o éster.

Más específicamente, esta peptidasa prolina-específica es una peptidasa prolina-específica que tiene las propiedades siguientes que se muestran en (1)-(8):

(1) Escinde al menos uno de los péptidos siguientes que contienen prolina en el sitio que se muestra con  $\downarrow$ , es decir, en el lado del terminal carboxilo del residuo prolina (en donde pNA es p-nitroanilida):

(en donde Xaa representa Pro-pNA y pNA representa p-nitroanilida))

Ala-Ala-Pro- $\downarrow$ -pNA, Ala-Phe-Pro- $\downarrow$ -pNA, Phe-Arg-Ala-Pro- $\downarrow$ -pNA (idéntico a Phe-Arg-Ala Xaa (SEQ ID NO:68) (en donde Xaa representa Pro-pNA y pNA representa p-nitroanilida))

(2) tiene el pH óptimo de 6,0-6,5;

(3) es estable a pH 4-9;

(4) tiene la temperatura óptima de 25-30°C;

(5) es estable por debajo de 20°C;

(6) su actividad es inhibida por fluoruro de fenilmetilsulfonilo, y fluoruro de aminoetilbencenosulfonilo-clorhidrato

(7) tiene el punto isoeléctrico de 10,2; y

(8) tiene el peso molecular de aproximadamente 50.000.

Por ejemplo, esta svPEP puede prepararse como se describe más adelante en esta memoria. Actinomicetos que producen las peptidasas que tienen actividades de svPEP, por ejemplo, el actinomiceto *S. mobaraense* IFO13819 se cultiva de acuerdo con el método utilizado convencionalmente para el cultivo de actinomicetos. El medio de cultivo para cultivar el actinomiceto IFO13819 puede ser el medio común que contiene fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, iones inorgánicos y otros, convencionales. Glucosa, almidón, sacarosa y otros pueden utilizarse como las fuentes de carbono, peptona, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, sales de amonio y otros se utilizan opcionalmente como las fuentes de nitrógeno en caso necesario. Los cultivos pueden incubarse en condición aerobia que está controlada adecuadamente dentro de, por ejemplo, el intervalo de pH comprendido entre pH 5,0 y 8,5 y el intervalo de temperatura entre 15 y 37°C. El periodo de cultivo es usualmente tan largo como 1 a 10 días, aunque depende de la temperatura, el pH y el tipo de medio. En principio, el cultivo puede terminarse en el momento en que se alcance la máxima cantidad del svPEP deseado.

Después de la incubación del cultivo durante el periodo arriba descrito, la preparación de svPEP purificada puede obtenerse por recuperación de las células del cultivo, lavado breve de las mismas, elución de la fracción que contiene

- ne svPEP de la superficie de las células y purificación del eluyente con la combinación de métodos de purificación tales como HPLC y FPLC bien conocidos por los expertos en la técnica que se utilizan convencionalmente para purificación de tales proteínas. La elución de la fracción svPEP de la superficie de las células puede realizarse por agitación de las células mediante sacudidas en una solución tampón tal como, por ejemplo, 0,1 M de tampón de fosfato de sodio (pH 7,0) durante un período dado de duración comprendida entre 1 y 5 horas.
- La temperatura durante el procedimiento está comprendida entre 0 y aproximadamente 5°C para prevenir la desactivación de la enzima. svPEP puede aislarse y purificarse del sobrenadante de los cultivos, pero contiene una gran cantidad de proteínas contaminadas y por consiguiente es más ventajoso eluir y purificar la proteína de la superficie de las células lavadas.
- Las fracciones activas en cada paso pueden confirmarse por determinación de las actividades de la enzima en las fracciones. La determinación de las actividades puede lograrse utilizando una combinación de sustratos apropiados y el método de detección de los productos de reacción, por ejemplo, por reacción de las enzimas con Ala-Ala-Pro-pNA, Ala-Phe-Pro-pNA, Phe-Arg-Ala-Pro-pNA como sustratos y medición de la cantidad de la pNA (p-nitroanilida) liberada por la reacción para cuantificar las actividades.
- Los genes que codifican svPEP pueden obtenerse por determinación de la secuencia parcial de aminoácidos y diseño de sondas apropiadas, opcionalmente después de purificar ulteriormente la svPEP, que se ha purificado como se ha descrito anteriormente, utilizando cromatografía de fase inversa, etc. Este procedimiento es bien conocido por los expertos en la técnica. Véase, v.g., *Molecular Cloning 2nd edition* [J. Sambrook, E.F. Fritsch y T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 31 (1989)]. La secuencia del gen para svPEP obtenido de este modo y la secuencia entera de los aminoácidos codificados por el mismo se muestran en SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42, respectivamente, y la secuencia de aminoácidos de la proteína madura de svPEP se muestra en SEQ ID NO: 40.
- Cuando se hace reaccionar svPEP sobre la protransglutaminasa junto con la proteasa en la forma de medio de *S. mobaraense* o células de *S. mobaraense*, la parte pro-estructural puede escindir-se por completo, dando como resultado la transglutaminasa madura cuya parte pro-estructural se ha eliminado por completo. Alternativamente, la transglutaminasa madura de la cual se ha eliminado por completo la parte pro-estructural puede obtenerse de modo análogo por cultivo de una bacteria corineforme en la cual se han introducido el gen pre-pro svPEP y un gen de proteasa junto con una bacteria corineforme que libera una protransglutaminasa extracelularmente por producción por secreción. Además, puede producirse eficientemente una transglutaminasa madura que tiene la misma estructura que la de una forma existente naturalmente introduciendo análogamente ambos genes SAMP45 y svPEP en una bacteria corineforme en la cual se ha introducido el gen de pre-protransglutaminasa, y dejando que la misma produzca por secreción pro-transglutaminasa y SAMP45 así como svPEP extracelularmente o en la superficie de las células.
- El método para introducir los constructos genéticos que pueden utilizarse en la presente invención en una bacteria corineforme no está limitado a métodos particulares, incluyendo los métodos utilizados generalmente, por ejemplo, el método de los protoplastos (*Gene*, 39, 281-286 (1985)), el método de electroporación (*Bio/Technology*, 7, 1067-1070) (1989)), etc. El transformante resultante puede cultivarse de acuerdo con los métodos y condiciones convencionales. Por ejemplo, el transformante puede cultivarse por un medio convencional que contiene fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y fuentes inorgánicas. Opcionalmente, pueden añadirse al medio cantidades traza de nutrientes orgánicos tales como vitaminas y aminoácidos a fin de conseguir el crecimiento en mayor cantidad.
- Pueden utilizarse carbohidratos tales como glucosa y sacarosa como fuentes de carbono, ácidos orgánicos tales como ácido acético, alcoholes y otros. Como fuentes de nitrógeno se pueden utilizar amoníaco gaseoso, amoníaco acuoso, sales de amonio y otros. Como iones inorgánicos, se utilizan opcionalmente en caso necesario ion calcio, ion magnesio, ion fósforo, ion potasio, ion ferroso o férrico, y otros. El cultivo se conduce durante aproximadamente 1 a 7 días en condición aerobia en el intervalo apropiado de pH entre 5,0 y 8,5, y el intervalo de temperatura entre 15°C y 37°C. Por cultivo del transformante en tales condiciones, se produce intracelularmente una gran cantidad de una proteína deseada y la misma se secreta eficientemente en el medio extracelular. Es sabido generalmente que la transglutaminasa es letal cuando la misma se acumula en gran cantidad en las células de microorganismos, pero de acuerdo con la presente invención, la transglutaminasa se produce continuamente sin producir efectos letales, dado que la transglutaminasa producida intracelularmente se libera en el medio extracelular.
- Las proteínas que se secretan en el medio de acuerdo con la presente invención pueden aislarse y purificarse del medio de cultivo incubado de acuerdo con los métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las proteínas pueden aislarse y purificarse retirando las células del medio por centrifugación, etc., y utilizando a continuación métodos conocidos apropiados tales como precipitación por salado, precipitación con etanol, ultrafiltración, cromatografía de filtración en gel, cromatografía en columna de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía líquida de presión media-alta, cromatografía de fase inversa, cromatografía hidrófoba o combinaciones de los mismos. Las proteínas secretadas en la superficie de las células de acuerdo con la presente invención pueden aislarse y purificarse utilizando los métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, por solubilización de las mismas con concentraciones incrementadas de sal o agentes tensioactivos, y utilización posterior de los métodos similares al utilizado para las proteínas secretadas en el medio. Adicionalmente, en algunos casos,

las proteínas secretadas en la superficie de la célula pueden utilizarse sin solubilización, por ejemplo, como enzimas inmovilizadas.

La presente invención se describe ulteriormente de modo específico en los ejemplos que siguen, que no deben interpretarse en modo alguno como limitación de la presente invención.

## 5 Ejemplos

### Ejemplo 1: Expresión de prepro-transglutaminasa derivada de S. mobaraense IFO13819 en C. glutamicum ATCC13869

(1) Adquisición del gen de transglutaminasa derivado de S. mobaraense IFO13819

10 La secuencia del gen de transglutaminasa derivado de la cepa de S. mobaraense DSMZ ha sido ya determinada [Eur. J. Biochem., 257, 570-576 (1998)]. Los iniciadores indicados en SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9 se sintetizaron por referencia a la secuencia y la región codificante de la secuencia de transglutaminasa madura se amplificó utilizando el método PCR con el DNA cromosómico de S. mobaraense IFO13819 preparado de acuerdo con el procedimiento convencional (el método de Saito y Miura [Biochem. Biophys. Acta, 72, 619 (1963)]. Para la reacción PCR, se utilizó DNA-polimerasa Pyrobest (Takarashuzo Co. Ltd.) y las condiciones de reacción siguieron el protocolo  
15 recomendado por el fabricante.

(SEQ ID NO: 8) 5'-GACTCCGACGACAGGGTCACCCCTCCCGCC-3'

(SEQ ID NO: 9) 5'-CGCTCACATCACGGCCAGCCCTGCTTTACC-3'

<Texto libre del listado de secuencias>

SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO:9: iniciador PCR

20 Se generó luego la sonda de DNA por reacción del fragmento amplificado de DNA de aproximadamente 1,0 kb con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP utilizando el Kit de Marcación de DNA Random Primer Ver. 2 (Takarashuzo Co. Ltd.) de acuerdo con el protocolo unido al Kit. Se confirmó que el gen de transglutaminasa estaba presente en el fragmento de aproximadamente 4 kb escindido con la enzima de restricción SacI por hibridación de transferencia Southern utilizando la sonda generada y el DNA cromosómico de S. mobaraense IFO13819 de acuerdo con el método convencional, como se describe en Molecular Cloning 2nd edition [J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p9. 31 (1989)].  
25

De acuerdo con ello, el fragmento de aproximadamente 4 kb que había sido generado por digestión con SacI del DNA cromosómico de S. mobaraense IFO13819 se recuperó por electroforesis en gel de agarosa utilizando EASYTRAP Ver. 2 (Takarashuzo Co. Ltd.) y se insertó en el sitio SacI de pUC18 (Takarashuzo Co. Ltd.) que se introdujo en células competentes de Escherichia coli JM109 (Takarashuzo Co. Ltd.) para generar una biblioteca.  
30

Se obtuvo la cepa bacteriana que contiene el plásmido en el cual se clonó el fragmento del gen de transglutaminasa, por cribado de la biblioteca utilizando la sonda de DNA generada previamente para transglutaminasa por hibridación de colonias como se describe en Molecular Cloning 2nd edition [J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p1. 90(1989)]. Se recuperó el plásmido de esta cepa y se designó como pUITG. Se determinó la secuencia del fragmento clonado en pUITG, lo cual confirmó que el gen de transglutaminasa de S. mobaraense IFO13819 tenía la misma secuencia que el de la transglutaminasa de la cepa DSMZ de S. mobaraense.  
35

La determinación de la secuencia de nucleótidos reveló que el fragmento SacI de aproximadamente 4 kb era el fragmento incompleto de DNA del cual se había delecionado parcialmente la secuencia señal (la pre-parte). Por esta razón, se intentó la clonación de la región promotora y la región de la secuencia señal entera. La clonación se realizó utilizando el Kit de Clonación in vitro TAKARA LA PCR (Takarashuzo Co. Ltd.) y los iniciadores sintéticos que se muestran en SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 de acuerdo con el protocolo unido.  
40

(SEQ ID. NO 10) 5'-GTGACCCTGTCGTCGGAGTC-3'

(SEQ ID NO: 11) 5'-GGCATCCTGTCGAGCGGCTC-3'

<Texto libre del listado de secuencias>

45 SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11: iniciadores PCR para la región promotora y la secuencia señal de S. mobaraense

Por consiguiente, cuando se utilizó una casete iniciadora de Sall, se obtuvo el fragmento de aproximadamente 800 pb amplificado por PCR y la secuenciación del fragmento confirmó que el fragmento contenía la región promotora y la región de secuencia señal para el gen de transglutaminasa. En consecuencia, se insertó el fragmento de aproximadamente 800 pb amplificado por PCR en el sitio SmaI de pVC7 descrito en JP-Kokai No. 9-070291 para obtener pVITGS5. Adicionalmente, el plásmido pUITG se digirió con SacI, se recuperó el fragmento de aproximadamente 4 kb por electroforesis en gel de agarosa, y se insertó el fragmento en el sitio SacI de pVITGS5 para construir el  
50

plásmido pVITGC que comprende el gen de transglutaminasa de longitud total. La determinación de la secuencia de nucleótidos se realizó utilizando el Kit de Secuenciación Dye Terminator Cycle (PE Applied Biosystems) y el secuenciador de DNA 373A (PE Applied Biosystems). La secuencia del gen de preprotransglutaminasa se muestra en SEQ ID NO: 12, en donde se cree que la secuencia de 31 aminoácidos del terminal N es la secuencia señal (la pre-parte).  
5 La secuencia de aminoácidos de la preprotransglutaminasa se muestra en SEQ ID NO: 13.

## (2) Conversión de la región promotora del gen de transglutaminasa

La secuencia del gen para PS2, que es una proteína de la superficie de *C. glutamicum*, ha sido ya determinada [Mol. Microbiol., 9, 97-109 (1993)]. Los iniciadores que se muestran en SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15 se sintetizaron recurriendo a la secuencia, y la región que comprende el promotor en la región aguas arriba de 5' del codón de iniciación del gen de la proteína PS2 se amplificó utilizando el método PCR a partir del DNA cromosómico de *C. glutamicum* ATCC13869 preparado de acuerdo con un método convencional.

(SEQ ID NO: 14) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG4-3'

(SEQ ID NO: 15) 5'-GAGCTCTCCGGCGTATGCGCATAGAGGCGAAGGCTCCTTGAATA-3'

<Texto libre del listado de secuencias>

## 15 SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO:15: iniciadores PCR

Por otra parte, los iniciadores que se muestran en SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 9 se sintetizaron basándose en la secuencia del gen de transglutaminasa determinada en el Ejemplo 1 (1), y la región del gen de preprotransglutaminasa se amplificó utilizando el método PCR a partir de pUITG obtenido en el Ejemplo 1 (1).

(SEQ ID NO: 16) 5'-ATGCGCATACGCCGGAGAGCTCTCGTCTTC-3'

## 20 <Texto libre del listado de secuencias>

SEQ ID NO: 16: iniciador PCR

A continuación, el gen de fusión de transglutaminasa fusionado con la parte estructural pre-pro adicional, que se ligó a la región que comprendía el promotor del gen de la proteína de la superficie celular de *C. glutamicum* ACC 13869, se amplificó por realización de una PCR de entrecruzamiento con SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 9 utilizando como moldes la mixtura de 1 µl de cada uno de la solución PCR de la región amplificada que comprendía el promotor del gen PS2 de *C. glutamicum* ATCC13869 y la región del gen de pre-protransglutaminasa amplificado. El fragmento amplificado de aproximadamente 1,8 kb se detectó por electroforesis en gel de agarosa. Este fragmento se recuperó a partir del gel de agarosa con EASYTRAP Ver. 2 (Takarashuzo Co. Ltd.) y se insertó en el sitio SmaI de pVC7 como se describe en JP-Kokai No. 9-070291 para obtener pVKPTGO. La secuencia de nucleótidos del fragmento insertado se determinó de acuerdo con el método arriba descrito y se confirmó que el gen de fusión se había construido como se esperaba.

## (3) Expresión del gen de pre-protransglutaminasa en *C. glutamicum* ATCC13869

Se transformó *C. glutamicum* ATCC13869 con el pVITGC construido en el Ejemplo 1 (1) (tanto el promotor como el gen de pre-protransglutaminasa se derivaban de *S. mobaraense*) o con el pVKPTGO construido en el Ejemplo 1 (2) (el promotor se derivaba del gen PS2 de *C. glutamicum* ATCC13869 y el gen de pre-protransglutaminasa se derivaba de *S. mobaraense*) y se seleccionaron las cepas que crecían en el medio de agar CM2S que comprendía 5 mg/l de cloranfenicol (10 g de extracto de levadura, 10 g de triptona, 5 g de sacarosa, 5 g de NaCl, 5 g de agar por litro de agua destilada). El *C. glutamicum* ATCC13869 seleccionado que hospedaba pVITGC o pVKPTGO se cultivó en medio de cultivo MM (30 g de glucosa, 0,4 g de sulfato de magnesio heptahidrato, 30 g de sulfato de amonio, 1 g de dihidrogenofosfato de potasio, 0,01 g de sulfato ferroso heptahidratado, 0,01 g de sulfato de manganeso (II) pentahidratado, 200 µg de hidrocloreto de tiamina, 500 µg de biotina, 0,15 g de DL-metionina, 50 g de carbonato de calcio por litro de agua destilada, ajustado a pH 7,5) que comprendía 5 mg/l de cloranfenicol a 30°C durante 48 horas, respectivamente. Después de terminada la incubación, se sometieron 10 µl del sobrenadante del cultivo a SDS - PAGE y luego a transferencia Western con anticuerpo anti-transglutaminasa como se describe en Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 82-87 (1994) de acuerdo con el método convencional (por ejemplo, el procedimiento general que se describe en J. Sambrook et al. (1989) (supra)).

Como consecuencia, no pudo detectarse la secreción de transglutaminasa. A partir de los resultados anteriores, se confirmó que la secuencia señal de transglutaminasa de *S. mobaraense* no funcionaba en *C. glutamicum* ATCC13869.

50

Ejemplo 2: Producción por secreción de transglutaminasa madura utilizando el gen de fusión codificante del péptido señal de la proteína de la superficie celular de *Corynebacterium glutamicum* (C. glutamicum ATCC13869) y la transglutaminasa madura derivada de *S. mobaraense* IFO13819

5 (1) Construcción del gen de transglutaminasa que contiene la secuencia señal de la proteína de la superficie celular de *C. glutamicum* ATCC13869

10 La secuencia del gen de PS2 que es la proteína de la superficie celular de *C. glutamicum* ha sido ya determinada [Mol. Microbiol., 9, 97-109 (1993)]. Se sintetizaron los iniciadores que se muestran en SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 17 recurriendo a la secuencia, y la región codificante de los 44 residuos de aminoácidos del terminal N (30 residuos de aminoácidos del péptido señal y 14 residuos de aminoácidos de la proteína madura de la superficie celular) de la proteína correspondiente a PS2 y la región aguas arriba de 5' que contenía la región promotora se amplificaron utilizando el método PCR con el DNA cromosómico de *C. glutamicum* ATCC13869 preparado de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1 (2). El iniciador que se muestra en SEQ ID NO: 17 comprende también la secuencia codificante de la secuencia de aminoácidos de la región terminal N de la transglutaminasa madura a fin de construir el gen de fusión fusionado con transglutaminasa.

15 (SEQ ID NO: 14) 5'- AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(SEQ ID NO:17)

5'-GGGGTGACCCTGTCGTCGGAGTCGTTGAAGCCGTTGTTGATGTTGAA-3'

<Texto libre del listado de secuencias>

SEQ ID NO: 17: iniciador PCR

20 Por otra parte, se sintetizaron los iniciadores que se muestran en SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9 basándose en la secuencia del gen de transglutaminasa determinada en el Ejemplo 1 (1) y la región del gen de transglutaminasa maduro se amplificó utilizando el método PCR con pUITG obtenido en el Ejemplo 1 (1).

25 El gen de fusión de la transglutaminasa madura, que estaba ligado a la región codificante de los 44 residuos de aminoácidos del terminal N de *C. glutamicum* ATCC13869 y a la región aguas arriba de 5' que comprendía el gen promotor del gen de la proteína de la superficie celular, se amplificó realizando una PCR de entrecruzamiento con SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 9 utilizando como moldes la mixtura de 1 µl de solución PCR de la región amplificada codificante de los 44 residuos de aminoácidos del terminal N de la proteína correspondiente a PS2 de *C. glutamicum* y la región aguas arriba de 5' que contenía el promotor, y 1 µl de solución PCR de la región amplificada de la región del gen de la transglutaminasa madura,.

30 El fragmento amplificado de aproximadamente 1,7 kb se detectó por electroforesis en agarosa. Este fragmento se recuperó del gel de agarosa utilizando EASYTRAP Ver. 2 (Takarashuzo Co. Ltd.) y se insertó en el sitio SmaI del pVC7 descrito en JP-Kokai No. 9-070291 para obtener pVKPTG3. La secuencia de nucleótidos del fragmento insertado se determinó de acuerdo con el método arriba descrito y se confirmó que se había construido el gen de fusión esperado.

35 Adicionalmente, el gen de fusión de la transglutaminasa madura de aproximadamente 1,7 kb, que se había ligado a la región codificante de los 44 residuos de aminoácidos del terminal N de *C. glutamicum* ATCC13869 y la región aguas arriba de 5' que comprendía el promotor del gen de la proteína de la superficie celular, se escindió por digestión de pVKTG3 con KpnI y XbaI y se recuperó utilizando electroforesis en agarosa. Este fragmento se insertó en el sitio KpnI-XbaI de pPK4 descrito en JP-Kokai No. 9-322774 para construir pPKTG3.

40 (2) Secreción de transglutaminasa madura utilizando la secuencia señal de la proteína de la superficie celular de *C. glutamicum* ATCC13869

45 Se transformó *C. glutamicum* ATCC13869 con el plásmido construido pVKTG3 o pPKTG3 (en ambos casos tanto el gen que comprendía el promotor como el gen codificante del péptido señal y los 14 residuos de aminoácidos del terminal N se derivaban de *C. glutamicum* ATCC13869, y el gen de transglutaminasa madura se derivaba de *S. mobaraense*) y se seleccionaron las cepas que crecían en el medio de agar CM2S que comprendía 5 mg/l de cloranfenicol o 25 mg/l de kanamicina. El *C. glutamicum* ATCC13869 seleccionado que contenía pVITG3 o pVKPTG3 se cultivó luego en medio de cultivo líquido MM, arriba descrito, que comprendía 5 mg/l de cloranfenicol o 25 mg/l de kanamicina a 30°C durante 48 horas, respectivamente. Después de terminada la incubación, se sometieron 10 µl del sobrenadante del cultivo a SDS-PAGE y se realizó luego una transferencia Western de acuerdo con un método convencional con anticuerpo anti-transglutaminasa como se describe en Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 82-87 (1994). Como resultado, pudo detectarse una pequeña cantidad de transglutaminasa secretada que tenía un peso molecular similar al de la transglutaminasa madura en el sobrenadante del medio de cultivo de ambas cepas.

Ejemplo 3: Producción por secreción de pro-transglutaminasa utilizando el gen de fusión de pro-transglutaminasa (gen de fusión de prepro-transglutaminasa fusionado heterológamente) derivado de *S. mobaraense* IFO13819 ligado al péptido señal de la proteína de la superficie celular de *C. glutamicum* ATCC13869

5 (1) Construcción del gen de transglutaminasa (gen de fusión de prepro-transglutaminasa fusionado heterológamente) que contenía la parte pro-estructural adicional con el péptido señal de la proteína de la superficie celular de *C. glutamicum* ATCC13869

10 Los iniciadores que se muestran en SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21 se sintetizaron recurriendo a la secuencia del gen de PS2 que era la proteína de la superficie celular de *C. glutamicum* [Mol. Microbiol., 9, 97-109 (1993)]. La región codificante para los 30, 31, 44 o 68 residuos de aminoácidos del terminal N (la región que comprende 30 residuos de aminoácidos del péptido señal) y la región aguas arriba de 5' que contenía la región promotora de la proteína correspondiente a PS2 se amplificaron por el método PCR utilizando la combinación de SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 18, o de SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 19, o de SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 20, o de SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 21 del DNA cromosómico de *C. glutamicum* ATCC13869 preparada de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1 (2).

15 Los iniciadores que se muestran en SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 21 comprenden las secuencias que codifican los aminoácidos del terminal N de pro-transglutaminasa con objeto de construir el gen de fusión fusionado con la transglutaminasa que tenía la parte pro-estructural.

(SEQ ID NO: 18)

5'-CTTCGTCTCTTCCCCCGCGCCATTGTCAGCGAATGCTGGGATAGCAACGCC-3'

20 (SEQ ID NO: 19)

5'-CTTCGTCTCTTCCCCCGCGCCATTGTCCTGAGCGAATGCTGGGATAGCTAC-3'

(SEQ ID NO: 20)

5'-CTTCGTCTCTTCCCCCGCGCCATTGTCGTTGAAGCCGTTGATGTTGA-3'

(SEQ ID NO: 21)

25 5'-CTTCGTCTCTTCCCCCGCGCCATTGTCAGTCAGGTCGCGGAGGGTTTCCTC-3'

<Texto libre del listado de secuencias>

SEQ ID NO: 18 a SEQ ID NO: 21: iniciadores PCR

30 Por otra parte, se sintetizaron los iniciadores que se muestran en SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 9 basándose en la secuencia del gen de transglutaminasa determinada en el Ejemplo 1 (1) y la región del gen de pro-transglutaminasa se amplificó utilizando el método PCR con pUITG obtenido en el Ejemplo 1 (1).

(SEQ ID: NO: 22) 5'-GACAATGGCGCGGGGAAGAGACGAAGTCC-3'

<Texto libre del listado de secuencias>

SEQ ID NO: 22: iniciador PCR

35 A continuación se amplificó el gen de pro-transglutaminasa fusionado heterológamente ligado a la región respectiva codificante de los 30, 31, 44 y 69 residuos de aminoácidos del terminal N y la región aguas arriba de 5' que comprendía la región promotora del gen de la proteína correspondiente a PS2 de *C. glutamicum* ATCC13869, es decir, los fragmentos de los genes prepro-transglutaminasa fusionados heterológamente que se ligaron al promotor del gen para la proteína de la superficie celular *C. glutamicum* ATCC13869, por realización de una PCR de entrecruzamiento con SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 9 utilizando como moldes la mixtura que comprendía 1 µl de solución PCR de la región aguas arriba de 5' que contenía la región promotora del gen de la proteína correspondiente a PS2 de *C. glutamicum* ATCC13869 y cada una de las regiones amplificadas codificantes de los 30, 31, 44 ó 68 residuos de aminoácidos del terminal N de la proteína, y 1 µl de solución PCR de la región amplificada del gen para la transglutaminasa que tenía la parte pro-estructural.

45 Los fragmentos amplificados que comprendían aproximadamente 1,8 kb a 1,9 kb se detectaron por electroforesis en agarosa. Estos fragmentos se recuperaron de los geles de agarosa con EASYTRAP Ver. 2 (Takarashuzo Co. Ltd.) y se insertaron en el sitio Smal de pVC7 como se describe en JP-Kokai No. 9-070291 para obtener pVKPTG1, pVKPTG2, pVKPTG3 y pVKPTG4, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos de los fragmentos insertados se determinaron de acuerdo con el método mencionado anteriormente y se confirmó que se habían construido los genes de fusión esperados.

Adicionalmente, los genes de fusión de aproximadamente 1,8 kb a 1,9 kb de transglutaminasa que tenían las partes pro-estructurales, que estaban ligadas a las regiones respectivas codificantes de los residuos de aminoácidos 30, 31, 44 y 68 y la región aguas arriba de 5' que comprendía la región promotora del gen de la proteína correspondiente a PS2 de *C. glutamicum*, se escindieron por digestión de pVKPTG1, pVKPTG2, pVKPTG3 y pVKPTG4 con KpnI y XbaI y se recuperaron por electroforesis en agarosa. Estos fragmentos se insertaron en el sitio KpnI-XbaI de pPK4 descrito en JP-Kokai No. 9-322774 para construir pPKPTG1, pPKPTG2, pPKPTG3 y pPKPTG4.

(2) Secreción de pro-transglutaminasa con la secuencia señal de la proteína de la superficie celular de *C. glutamicum* ATCC13869

Se transformó *C. glutamicum* ATCC13869 con el plásmido construido pVKPTG1, pVKPTG2, pVKPTG3, pVKPTG4, pPKPTG1, pPKPTG2, pPKPTG3 o pPKPTG4 y se seleccionaron las cepas que habían crecido en el medio de agar CM2S, arriba descrito, que comprendía 5 mg/l de cloranfenicol o 25 mg/ml de kanamicina. El *C. glutamicum* ATCC13869 seleccionado que hospedaba pVKPTG1, pVKPTG2, pVKPTG3, pVKPTG4, pPKPTG1, pPKPTG2, pPKPTG3 o pPKPTG4 se cultivó luego en el medio de cultivo MM, arriba descrito, que comprendía 5 mg/l de cloranfenicol o 25 mg/l de kanamicina a 30°C durante 48 horas, respectivamente. Una vez terminada la incubación, se sometieron 10 µl del sobrenadante del cultivo a SDS-PAGE y se realizó luego una transferencia Western utilizando anticuerpo anti-transglutaminasa como se describe en Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 82-87 (1994) de acuerdo con el método convencional. Como resultado, se confirmó para ambos vectores la secreción de la cantidad similar de transglutaminasa que tenía la parte pro-estructural, pVC7 o pPK4, y se observó la diferencia significativa en la cantidad secretada dependiendo de la longitud de los residuos de aminoácidos del terminal N de la forma madura de la proteína correspondiente a PS2. Las cantidades representativas secretadas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. La cantidad secretada de pro-transglutaminasa utilizando la secuencia señal de la proteína de la superficie celular de *C. glutamicum* ATCC13869

Plásmido	pro-transglutaminasa (mg/l)
pPKPTG1	78
pPKPTG4	210

(3) Escisión de las pro-transglutaminasas por digestión con Dispasa y detección de sus actividades

Al sobrenadante del cultivo de *C. glutamicum* ATCC13869 que hospedaba pVKPTG1, pVKPTG2, pVKPTG3, pVKPTG4, pPKPTG1, pPKPTG2, pPKPTG3 o pPKPTG4, se añadió la proteasa Dispasa (Boehringer Mannheim Co. Ltd.) en una ratio sustrato:enzima = 1:1 y se mantuvo la reacción a 37°C, pH 7,5 durante una hora. Después de la digestión con Dispasa, se confirmó la escisión de las pro-transglutaminasas por SDS-PAGE, y se confirmaron las actividades específicas similares (aproximadamente 20 U/mg) a la de la transglutaminasa existente naturalmente, como se determinó por el método del hidroxamato [J. Biol. Chem., 241, 5518-5525 (1966)].

Ejemplo 4: Producción por secreción de pro-transglutaminasa utilizando el gen de fusión que tiene la secuencia codificante de la secuencia señal de la proteína de la superficie celular de *C. ammoniagenes* y la pro-transglutaminasa derivada de *S. mobaraense* IFO13819

(1) Construcción del gen de transglutaminasa que tiene la parte pro-estructural adicional y la secuencia señal de la proteína de la superficie celular de *C. ammoniagenes* (gen de fusión de prepro-transglutaminasa fusionado heterológicamente)

Los iniciadores que se muestran en SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24 se sintetizaron recurriendo a la secuencia del gen de la proteína de la superficie celular (SlpA) [JP-Kokai No. 10-108675] de *C. ammoniagenes*, y la región que comprendía la región aguas arriba de 5' que contenía la región promotora de la proteína de la superficie celular (SlpA) y la región codificante de los 25 residuos de aminoácidos del terminal N (el péptido señal) se amplificaron utilizando el método PCR a partir del DNA cromosómico de *C. ammoniagenes* preparado de acuerdo con el método convencional. El iniciador que se muestra en SEQ ID NO: 24 comprende también la secuencia codificante de los aminoácidos del terminal N de la pro-transglutaminasa a fin de construir el gen de fusión fusionado con la pro-transglutaminasa.

(SEQ ID NO: 23) 5'-GCCAGAAAGCCCAAAATTGAGATTT-3'

(SEQ ID NO: 24) 5'-CTTCGTCTCTTCCCCCGCGCCATTGTCTGCCGTTGCGACAGGTGCGGCCAGC

-3'

<Texto libre del listado de secuencias>

SEQ ID NO:23 y SEQ ID NO:24: iniciadores PCR

El gen de fusión transglutaminasa-transglutaminasa que contenía la parte pro-estructural adicional que estaba ligada a la región codificante de los 25 residuos de aminoácidos del terminal N de *C. ammoniagenes* y la región aguas arriba de 5' que comprendía la región promotora del gen de la proteína de la superficie celular (SlpA) (gen de prepro-transglutaminasa fusionado heterológamente) se amplificó por realización de una PCR de entrecruzamiento con SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 9 utilizando la mezcla como moldes que contenían 1 µl de solución PCR de la región amplificada aguas arriba de 5' que contenía la región promotora del gen de la proteína de la superficie celular (SlpA) y la región amplificada codificante de los 25 residuos de aminoácidos del terminal N de la proteína de la superficie celular (SlpA) de *C. ammoniagenes*, y 1 µl de solución PCR de la reacción del gen para la transglutaminasa que tenía la parte pro-estructural adicional que se había amplificado en el Ejemplo 3 (1). El fragmento amplificado de aproximadamente 1,7 kb se detectó por electroforesis en agarosa. Este fragmento se recuperó del gel de agarosa utilizando EASYTRAP Ver. 2 (Takarashuzo Co. Ltd.) y se insertó en el sitio SmaI de pVC7 para obtener pVSPTG1.

(2) Conversión de la región promotora: ligación con el promotor del gen de la proteína de la superficie celular de *C. glutamicum* ATCC13869

Los iniciadores que se muestran en SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 25 se sintetizaron recurriendo a la secuencia del gen de PS2 que es la proteína de la superficie celular [Mol. Microbiol., 9, 97-109 (1993)] de *C. glutamicum*. La región aguas arriba de 5' que comprendía la región promotora del gen para la proteína correspondiente a PS2 se amplificó utilizando el método PCR a partir del DNA cromosómico de *C. glutamicum* ATCC13869 preparado de acuerdo con el método del Ejemplo 1 (2). El iniciador que se muestra en SEQ ID NO: 25 comprende también la secuencia codificante de los aminoácidos del terminal N de la secuencia señal de la proteína de la superficie celular (SlpA) de *C. ammoniagenes* a fin de construir el gen de fusión fusionado del gen de transglutaminasa que tiene la parte pro-estructural fusionada con la secuencia señal de la proteína de la zona superficial (SlpA) de *C. ammoniagenes* (gen de fusión de prepro-transglutaminasa fusionado heterológamente).

(SEQ ID NO: 25) 5'-CGCAGCCAGCGATTTTCATGCGTTTCATAGAGGCGAAGGCTCCTTGAATAGGT-3'

<Texto libre del listado de secuencias>

SEQ ID NO:25: iniciador PCR

Por otra parte, se sintetizaron los iniciadores que se muestran en SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 9 basándose en la secuencia del gen de fusión de transglutaminasa que tenía la parte pro-estructural adicional, que contenía la secuencia señal de la proteína de la superficie celular (SlpA) de *C. ammoniagenes*, y la región de la transglutaminasa que tenía la parte pro-estructural adicional, que contenía la secuencia señal de la proteína de la superficie celular (SlpA) de *C. ammoniagenes*, se amplificó utilizando el método PCR a partir de pVSPTG1 obtenido en el Ejemplo 4 (1).

(SEQ ID NO:26) 5'-ATGAAACGCATGAAATCGCTGGCTGCGGCG-3'

<Texto libre del listado de secuencias>

SEQ ID NO:26: iniciador PCR

El gen de fusión de transglutaminasa que tenía la parte pro-estructural, que se ligó a la región codificante de los 25 residuos de aminoácidos del terminal N de la proteína de la superficie celular (SlpA) de *C. ammoniagenes* y a la región aguas arriba de 5' que contenía la región promotora del gen de la proteína correspondiente a PS2 de *C. glutamicum* ATCC13869, se amplificó luego realizando una PCR de entrecruzamiento con SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 9 utilizando la mezcla que comprendía 1 µl de solución PCR de la región aguas arriba de 5' amplificada que contenía la región promotora del gen para la proteína correspondiente a PS2 de *C. glutamicum* y 1 µl de solución PCR de la región amplificada del gen para la transglutaminasa que tenía la parte pro-estructural que tenía la secuencia señal de la proteína de la superficie celular (SlpA) de *C. ammoniagenes* (gen de prepro-transglutaminasa fusionado heterológamente).

El fragmento amplificado de aproximadamente 1,8 kb se detectó por electroforesis en agarosa. Este fragmento se recuperó del gel de agarosa utilizando EASYTRAP Ver. 2 (Takarashuzo Co. Ltd.) y se insertó en el sitio SmaI de pVC7 descrito en JP-Kokai No. 9-070291 para obtener pVKSPG1. La secuencia de nucleótidos del fragmento insertado se determinó de acuerdo con el método mencionado anteriormente y se confirmó que se había construido el gen de fusión esperado.

El gen de fusión de aproximadamente 1,8 kb del gen de fusión para transglutaminasa que tenía la pro-estructura, que estaba ligado a la región codificante de los 25 residuos de aminoácidos del terminal N (péptido señal) de la proteína de la superficie celular (SlpA) de *C. ammoniagenes* y comprendía la región aguas arriba de 5' que contenía la región promotora del gen de la proteína correspondiente a PS2 de *C. glutamicum* ATCC13869, se escindió por digestión de pVKSPG1 con KpnI y XbaI y se recuperó utilizando electroforesis en agarosa. Este fragmento se insertó en el sitio KpnI-XbaI de pPK4 descrito en JP-Kokai No. 9-322774 para construir pPKSPG1. Ambos plásmidos,

pVKSP1TG1 y pPKSP1TG1 comprendían el promotor del gen PS2 de *C. glutamicum* ATCC13869, el gen del péptido señal de S1pA de *C. ammoniagenes* y el gen de transglutaminasa de *S. mobaraense*.

(3) Conversión en el promotor tac de *E. coli*

5 Los iniciadores que se muestran en SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28 se sintetizaron basándose en la secuencia del plásmido pKK223-3 (Amersham Pharmacia Co. Ltd.) en donde se clonó el promotor tac de *E. coli*. La región correspondiente al promotor tac se amplificó utilizando el método PCR a partir de DNA de pKK223-3. El iniciador representado en SEQ ID NO: 28 comprende también la secuencia codificante de la secuencia de aminoácidos del terminal N de la secuencia señal de la proteína de la superficie celular (S1pA) de *C. ammoniagenes* a fin de construir el gen de fusión que tenía la parte pro-estructural, que contenía la secuencia señal de la proteína de la superficie celular (S1pA) de *C. ammoniagenes* (gen de prepro-transglutaminasa fusionado heterológamente).

(SEQ ID NO: 27) 5'-GGATCCGGAGCTTATCGACTGCACG-3'

(SEQ ID NO: 28) 5'-CGCAGCCAGCGATTTTCATGCGTTTCATAATTCTGTTTCCTGTGTGAAATTGT-3'

<Texto libre del listado de secuencias>

SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28: iniciadores PCR

15 El gen de fusión para transglutaminasa que tenía la parte pro-estructural adicional, que estaba ligada a la región codificante de los 25 residuos de aminoácidos del terminal N de la proteína de la zona superficial (S1pA) de *C. ammoniagenes* y que contenía el promotor tac (gen de prepro-transglutaminasa fusionado heterológamente), se amplificó por realización de una PCR de entrecruzamiento con SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 9 utilizando la mixtura de 1 µl de solución PCR de la región amplificada correspondiente al promotor tac y 1 µl de solución PCR de la región  
20 amplificada del gen para transglutaminasa que tenía la parte pro-estructural, que contenía la secuencia señal de la proteína de la superficie celular (S1pA) de *C. ammoniagenes*, como moldes. El fragmento amplificado de aproximadamente 1,5 kb se detectó por electroforesis en agarosa. Este fragmento se recuperó del gel de agarosa por EASYTRAP Ver. 2 (Takarashuzo Co. Ltd.) y se insertó en el sitio SmaI del pVC7 como se describe en JP-Kokai No. 9-070291 para obtener pVTSP1TG1. La secuencia de nucleótidos del fragmento insertado se determinó de acuerdo  
25 con el método antes mencionado y se confirmó que se había construido el gen de fusión esperado.

El gen de fusión de aproximadamente 1,5 kb para transglutaminasa que tenía la parte pro-estructural, que se ligó a la región codificante de los 25 residuos de aminoácidos del terminal N de la proteína de la superficie celular (S1pA) de *C. ammoniagenes* y el promotor tac, se escindió por digestión de pVTSP1TG1 con KpnI y XbaI y se recuperó utilizando electroforesis en agarosa. Este fragmento se insertó en el sitio KpnI-XbaI de pPK4 descrito en JP-Kokai No.  
30 9-322774 para construir pPTSPTG1. Ambos plásmidos pVTSP1TG1 y pPTSPTG1 comprendían el promotor tac derivado de *E. coli*, el gen del péptido señal derivado de S1pA de *C. ammoniagenes* y el gen de pro-transglutaminasa derivado de *S. mobaraense*.

(4) Secreción de la pro-transglutaminasa utilizando la secuencia señal de la proteína de la superficie celular de *C. ammoniagenes*

35 Se transformó *C. glutamicum* ATCC13869 con el plásmido construido pVKSP1TG1, pVTSP1TG1, pPKSP1TG1, o pPTSPTG1 y se seleccionaron las cepas cultivadas en el medio de agar CM2S, arriba descritas, que comprendían 5 mg/l de cloranfenicol o 25 mg/l de kanamicina. El *C. glutamicum* ATCC13869 seleccionado que hospedaba pVKSP1TG1, pVTSP1TG1, pPKSP1TG1, o pPTSPTG1 se cultivó luego en el medio de cultivo MM, arriba descrito, que comprendía 5 mg/l de cloranfenicol o 25 mg/l de kanamicina a 30°C durante 48 horas, respectivamente. Una vez  
40 terminada la incubación, se sometieron 10 µl del sobrenadante del cultivo a SDS-PAGE y se realizó luego una transferencia Western con anticuerpo anti-transglutaminasa como se describe en Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 82-87 (1994) de acuerdo con el método convencional. Como resultado, se confirmó que se secretaba la cantidad exhibida de transglutaminasa por cualquiera de los vectores, pVC7 o pPK4. Las cantidades representativas de la secreción se muestran en la Tabla 2.

45 Tabla 2. La cantidad secretada de pro-transglutaminasa utilizando la secuencia señal de la proteína de la superficie celular de *C. ammoniagenes* ATCC13869

Plásmido	Protransglutaminasa (mg/l)
pPKSP1TG1	102
pPTSPTG1	74

(5) Escisión de protrans-transglutaminasa por digestión con Dispasa y detección de la actividad

50 Se añadió al sobrenadante del cultivo de *C. glutamicum* ATCC13869 que hospedaba pVKSP1TG1, pVTSP1TG1, pPKSP1TG1, o pPTSPTG1, una proteasa Dispasa (Boehringer Mannheim Co. Ltd.) en una ratio de sustrato:enzima =

1:1 y la reacción se mantuvo a 37°C y pH 7,5 durante una hora. Después de la digestión con Dispasa, se sometió la mixtura de reacción a SDS-PAGE para confirmar la escisión de la protransglutaminasa que tenía la parte pro-estructural, y se confirmó que estaba contenida una actividad específica similar (aproximadamente 20 U/mg) a la de la transglutaminasa existente naturalmente, después de determinar la actividad de transglutaminasa por el método del hidroxamato.

Ejemplo 5: Escisión de protransglutaminasa utilizando el medio de cultivo o las células de *S. mobaraense* y la detección de la actividad.

(1) Escisión de protrans-transglutaminasa utilizando el medio de cultivo y la detección de la actividad

Se cultivó la cepa de *S. mobaraense* IFO13819 en medio de cultivo ISP2 (4 g de extracto de levadura, 10 g de extracto de malta, 4 g de glucosa por litro de agua destilada, ajustado a pH 7,3) a 30°C durante 24 horas. A 10 ml del medio de cultivo se añadió el sobrenadante del cultivo de *C. glutamicum* ATCC13869 que hospedaba pVKSPTG1, pVTSPTG1, pPKSPTG1, o pPTSPTG1, que se utilizó también en el Ejemplo 4 (5) y donde se acumulaba pro-transglutaminasa, después de filtración a través de un filtro de membrana, y el medio de cultivo se mantuvo a 30°C durante 6 horas. Se sometió luego a SDS-PAGE para confirmar la escisión de la transglutaminasa que tenía la parte pro-estructural. Se confirmó la actividad de la transglutaminasa, que tenía la actividad específica similar (aproximadamente 20 U/mg) a la de la transglutaminasa existente naturalmente como se determinó por el método del hidroxamato. Ulteriormente, se transfirió en condiciones semisecas sobre una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF) después de SDS-PAGE (Análisis Estructural de Proteínas para Clonación de Genes, Tokyo Kagaku Dojin (1993)). Después de la transferencia, la membrana de PVDF se tiñó con Azul Brillante Coomassie, se destiñó y se secó al aire. La porción que contenía la transglutaminasa madura se escindió y se analizó respecto a la secuencia de aminoácidos del terminal N utilizando un Secuenciador de Proteínas (Modelo 476A, Perkin Elmer Co. Ltd.). Como resultado, se confirmó que la proteína tenía la misma secuencia de aminoácidos que la de la transglutaminasa madura existente naturalmente representada en SEQ ID NO: 5.

(2) Escisión de transglutaminasa con la parte pro-estructural utilizando las células de la cepa de *S. mobaraense* IFO13819

Se cultivó la cepa de *S. mobaraense* IFO13819 en medio de cultivo ISP2 a 30°C durante 24 horas. Las células se cosecharon por centrifugación de 10 ml del medio de cultivo y se lavaron dos veces con solución salina. Las células cosechadas finalmente se suspendieron en 10 ml de solución salina. Después de filtrar, se añadieron a las suspensiones 10 ml del sobrenadante del cultivo de *C. glutamicum* ATCC13869 que hospedaba pVKSPTG1, pVTSPTG1, pPKSPTG1, o pPTSPTG1, que se utilizó también en el Ejemplo 4 (5) y donde se acumulaba la pro-transglutaminasa, y la mezcla se mantuvo a 30°C durante 6 horas. Se sometió luego la misma a SDS-PAGE y se confirmó la escisión de la transglutaminasa que tenía la parte pro-estructural, y la actividad de transglutaminasa que exhibía una actividad específica similar (aproximadamente 20 U/mg) a la de la transglutaminasa existente naturalmente se confirmó que estaba contenida como se determinó por el método del hidroxamato. Ulteriormente, se transfirió la misma en condiciones semisecas sobre una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF) después del proceso SDS-PAGE (Structural Analysis of Proteins for Gene Cloning, Tokyo Kagaku Dojin (1993)). Después de la transferencia, la membrana de PVDF se tiñó con Azul Brillante Coomassie, se destiñó y se secó al aire. La porción que contenía la transglutaminasa madura se escindió y se analizó respecto a la secuencia de aminoácidos del terminal N utilizando un Secuenciador de Proteínas.

Como resultado, se confirmó que la proteína tenía la misma secuencia de aminoácidos que la de la transglutaminasa madura existente naturalmente representada en SEQ ID NO: 5.

Ejemplo 6: Producción por secreción de pro-transglutaminasa utilizando el gen de fusión que contiene la secuencia codificante de la secuencia señal de la proteína de la superficie celular de *C. ammoniagenes* y la pro-transglutaminasa derivada de *Streptovercillium cinnamoneum* IFO12852

(1) Construcción del gen de fusión que comprende la secuencia codificante de la secuencia señal de la proteína de la superficie celular de *C. ammoniagenes* y la secuencia codificante de la pro-transglutaminasa derivada de *S. cinnamoneum* IFO12852.

La secuencia del gen de transglutaminasa de *S. cinnamoneum* IFO12852 ha sido determinada [Solicitud de Patente Japonesa No. 11-295649]. Se supone que la región de la posición 1 a la posición 32 en la secuencia de aminoácidos es la secuencia de la pre-parte, suponiéndose que desde la posición 33 a la posición 86 es la secuencia de la pro-parte y suponiéndose que desde la posición 87 a la posición 416 es la secuencia para la secuencia de glutaminasa madura. Las secuencias supuestas de la parte pro-estructural y la proteína madura se muestran en SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 43, respectivamente. Adicionalmente, *Escherichia coli* AJ 13669 que se había transformado con el plásmido pUJ-MTG que contenía el gen ha sido depositado en el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana, Agencia de Ciencia y Tecnología Industrial, en fecha 14 de octubre de 1999 como FERM P-17602 y ha sido transferido al depósito conforme al tratado de Budapest en fecha 28 de agosto de 2000, habiéndosele asignado el número de depósito FERM BP-7287.

La región de 3,5 kb que abarcaba la longitud total del gen de prepro-transglutaminasa se escindió primeramente a partir de pUJ-MTG con la enzima de restricción BamHI, y se generó pUCSCTG en donde la región se insertó en el sitio BamHI de pUC19.

- 5 Los iniciadores que se muestran en SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 45 se sintetizaron, y la región del gen que comprendía la pro-transglutaminasa derivada de *S. cinnamoneum* IFO12852 se amplificó por el método PCR utilizando pUCSCTG como molde, conforme a lo descrito anteriormente.

(SEQ ID NO: 44) 5'-GGC GAT GGG GAA GAG AAG GGG-3'

(SEQ ID NO: 45) 5'-GGC GGA TCC TVG CGT CGA GAG GCG TGG ACT GA-3'

<Texto libre del listado de secuencias>

- 10 SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 45: iniciadores PCR

La región, que comprende la región aguas arriba de 5' que contiene la región promotora del gen PS2 que es la proteína de la superficie celular de *C. glutamicum* y la región que contiene la secuencia señal de la proteína de la superficie celular SlpA de *C. ammoniagenes*, se amplificó luego por realización de una PCR utilizando la combinación de SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 47 a partir de pPKSPTG1 como molde, que se construyó en el Ejemplo 4 (2).

- 15 El iniciador que se muestra en SEQ ID NO: 47 comprende también la secuencia codificante de la secuencia de aminoácidos del terminal N de la pro-transglutaminasa derivada de *Streptovercillium cinnamoneum* IFO12852 a fin de construir el gen de fusión con la transglutaminasa derivada de *Streptovercillium cinnamoneum* IFO12852.

(SEQ ID NO: 46) 5'-TAC GAA TTC GAG CTC GGT ACC-3'

(SEQ ID NO: 47) 5'-CCC CTT CTC TTC CCC ATC GCC TGC CGT TGC CAC AGG TGC GGC C -3'

- 20 <Texto libre del listado de secuencias>

SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 47: iniciadores PCR

- 25 El fragmento del gen de prepro-transglutaminasa fusionado heterológamente, que estaba ligado a la secuencia señal de la proteína de la superficie celular SlpA de *C. ammoniagenes* y la región aguas arriba de 5' que comprendía la región promotora del gen PS2 se amplificó realizando una PCR de entrecruzamiento con SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 45 utilizando como moldes la mezcla que comprendía 1 µl de solución PCR de la región amplificada codificante del gen para la pro-transglutaminasa derivada de *C. cinnamoneum* IFO12852 y 1 µl de solución PCR de la región aguas arriba de 5' amplificada que contenía la región promotora del gen PS2 y la región amplificada que comprendía la secuencia señal de la proteína de la superficie celular SlpA de *C. ammoniagenes*.

El fragmento amplificado de aproximadamente 1,8 kb se detectó por electroforesis en agarosa.

- 30 Este fragmento se digirió con EcoRI y BamHI, y se recuperó luego del gel de agarosa, después de lo cual se insertó en el sitio EcoRI-BamHI del pUC19 para obtener pUKSPTG2'. La secuencia del fragmento insertado se determinó de acuerdo con el método antes mencionado y se confirmó que el gen de fusión se había construido como era de esperar. Este pUKSPTG2' se digirió con EcoRI y se hizo romo en los extremos con Blunting Kit (Takarashuzo Co. Ltd.), y el enlazador XbaI (Takarashuzo Co. Ltd.) que tenía la secuencia 5'-CTCTAGAG-3' en donde el terminal 5' se fosforiló y se insertó y recicló luego para construir pUKSPTG2. El gen de prepro-transglutaminasa fusionado de aproximadamente 1,8 kb (el gen de pro-transglutaminasa se derivaba de *S. cinnamoneum* IFO12852) se escindió por digestión de pUKSPTG2 con XbaI y se recuperó utilizando electroforesis en agarosa. Estos fragmentos se insertaron en el sitio XbaI de pPK4 descrito anteriormente para construir pPKSPTG2.

- 40 Se construyó la prepro-transglutaminasa que tenía una parte pro-estructural quimérica, en la cual el terminal N de la parte pro-estructural se había reemplazado parcialmente por la parte pro-estructural de *S. mobaraense* (el gen de la transglutaminasa madura y la parte de la parte pro-estructural se derivaban de *S. cinnamoneum* IFO12852).

- 45 En primer lugar, el fragmento de aproximadamente 1,8 kb que contenía el gen de prepro-transglutaminasa de EcoRI-BamHI se escindió del plásmido pPKSPTG1 (para la expresión de la pro-transglutaminasa derivada de *S. mobaraense* IFO13819) que se construyó en el Ejemplo 4 (2), y el fragmento se insertó en el sitio EcoRI-BamHI de pUC19 (pUKSPTG1). El fragmento de aproximadamente 1,2 kb se escindió por digestión de pUKSPTG1 con AatII, y pUKSPTG2' se digirió también con AatII para preparar el fragmento de aproximadamente 3,3 kb eliminando el fragmento de aproximadamente 1,2 kb. Este fragmento de aproximadamente 3,3 kb se ligó al fragmento AatII de aproximadamente 1,2 kb derivado de pUKSPTG1, y los clones en los cuales se había insertado el fragmento AatII se seleccionaron de acuerdo con las técnicas convencionales de ingeniería genética. Con objeto de determinar en qué orientación se había insertado el fragmento AatII en los clones, se secuenciaron éstos serialmente y se seleccionaron los clones en los que el fragmento se había insertado en la orientación deseada (pUKSPTG3'). Además, el sitio EcoRI de pUKSPTG3' se hizo también romo en los extremos como en el caso de pUKSPTG2' y el enlazador XbaI se

insertó para construir pUKSPTG3. Posteriormente, el fragmento XbaI de 1,8 kb escindido de pUKSPTG3 se insertó en el sitio XbaI de pPK4 para construir pPKSPTG3.

(2) Secreción de la pro-transglutaminasa derivada de *Streptovercillium cinnamoneum* IFO12852 utilizando la secuencia señal de la proteína de la superficie celular de *C. ammoniagenes*.

- 5 Se transformó *C. glutamicum* ATCC13869 utilizando el plásmido pPKSPTG2 o pPKSPTG3, y se seleccionaron las cepas que crecían en el medio de agar CM2S arriba descrito que comprendía 25 mg/l de kanamicina. La cepa seleccionada de *C. glutamicum* ATCC13869 que hospedaba pPKSPTG2 o pPKSPTG3 se cultivó luego respectivamente en medio de cultivo líquido MMTG (60 g de glucosa, 0,4 g de sulfato de magnesio heptahidratado, 30 g de sulfato de amonio, 1 g de dihidrogenofosfato de potasio, 0,01 g de sulfato ferroso heptahidratado, 0,01 g de sulfato de manganeso (II) pentahidratado, 450 µg de hidrócloruro de tiamina, 450 µg de biotina, 0,15 g de DL-metionina, 50 g de carbonato de calcio por litro de agua destilada, ajustado a pH 7,5) que contenía 25 mg/l de kanamicina a 30°C durante 3 días. Una vez terminada la incubación, se sometieron 10µl del sobrenadante del cultivo a SDS -PAGE y se realizó luego un análisis por transferencia Western de acuerdo con el método convencional con anticuerpo anti-transglutaminasa como se ha descrito anteriormente. El anticuerpo es un anticuerpo para la transglutaminasa derivada de *S. mobaraense*, pero exhibía también reactividad frente a la transglutaminasa derivada de *S. cinnamoneum*. De este modo se confirmó la secreción de la transglutaminasa que tenía la parte pro-estructural derivada de *S. cinnamoneum* IFO12852 (aproximadamente 30 a 50 mg/l).

20 Ejemplo 7: Producción por secreción de transglutaminasa por reemplazamiento de la parte pro-estructural de la pro-transglutaminasa derivada de *S. mobaraense* IFO13819 por la parte pro-estructural derivada de *S. cinnamoneum* IFO12852 (generación del híbrido)

25 Los iniciadores que se muestran en SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 48 y la región aguas arriba de 5' que comprendía la región promotora del gen PS2 de *C. glutamicum* ATCC13869 y la región codificante de la secuencia señal de la proteína de la superficie celular de *C. ammoniagenes*, así como la parte pro-estructural de la transglutaminasa derivada de *S. cinnamoneum* IFO12852 se amplificaron a partir de pPKSPTG2 o pPKSPTG3 utilizando el método PCR, respectivamente.

30 El iniciador que se muestra en SEQ ID NO: 48 comprende también la secuencia codificante de la secuencia de aminoácidos del terminal N de la transglutaminasa madura derivada de *S. mobaraense* IFO13819 a fin de construir el gen de fusión que contenía la región aguas arriba de 5' que contenía la región promotora del gen PS2 de *C. glutamicum* ATCC13869, la secuencia señal de la proteína de la superficie celular (SlpA) de *C. ammoniagenes* y el gen para la transglutaminasa madura derivada de *S. mobaraense* IFO13819 que tenía la parte pro-estructural de la transglutaminasa derivada de *Streptovercillium cinnamoneum* IFO12852

(SEQ ID NO: 14) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG3'

(SEQ ID NO: 48) 5'-GGG GTG ACC CTG TCG TCG GAG TCG GGG GCC CGG GAG GGC GCG CTG G-3'

<Texto libre del listado de secuencias>

35 SEQ ID NO: 48: iniciador PCR

Por otra parte, se sintetizaron los iniciadores que se muestran en SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9 basándose en la secuencia del gen de transglutaminasa derivado de *S. mobaraense* determinada en el Ejemplo 1 (1) y la región del gen de la transglutaminasa madura derivada de *S. mobaraense* se amplificó utilizando el método PCR a partir de pUITG que se había obtenido en el Ejemplo 1 (1).

40 (SEQ ID NO: 8) 5'-GACTCCGACGACAGGGTCACCCCTCCCGCC-3'

(SEQ ID NO: 9) 5'-CGCTCACATCACGGCCAGCCCTGCTTTACC-3'

<Texto libre del listado de secuencias>

SEQ ID NO: 8 y 9: iniciadores PCR

45 A continuación, el fragmento para el gen de fusión del gen de la transglutaminasa madura derivado de *S. mobaraense* IFO13819, que tenía la región aguas arriba de 5' que contenía la región promotora del gen PS2 de *C. glutamicum* ATCC13869, la secuencia señal de la proteína de la superficie celular de *C. ammoniagenes* y la parte pro-estructural de la pro-transglutaminasa derivada de *Streptovercillium cinnamoneum* IFO12852, se amplificó utilizando como molde PCR de entrecruzamiento con SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 9 empleando 1 ml de solución PCR de cada región amplificada que comprendía la región aguas arriba de 5' que contenía la región promotora del gen PS2 de *C. glutamicum* ATCC13869, la región codificante de la secuencia señal de la proteína de la superficie celular (SlpA) de *C. ammoniagenes* y la secuencia codificante de la parte pro-estructural de la transglutaminasa derivada de *S. cinnamoneum* IFO12852, así como 1 µl de solución PCR de la región amplificada del gen codificante de la transglutaminasa madura derivada de *S. mobaraense* IFO13819. El fragmento amplificado de aproximadamente 1,8 kb se

detectó por electroforesis en agarosa. El fragmento de aproximadamente 800 pb, que se generó por digestión del fragmento con Scal y Eco065I, se recuperó del gel de agarosa. El fragmento escindido de pKSPTG1, que se había construido en el Ejemplo 4 (2), por digestión con Scal y Eco065I se reemplazó por este fragmento para construir pPKSPTG4 y pPKSPTG5.

5 (SEQ ID NO: 14) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(SEQ ID NO: 9) 5'-CGCTCACATCACGGCCAGCCCTGCTTTACC-3'

(2) Secreción de la transglutaminasa derivada de *S. mobaraense* IFO13819 utilizando la secuencia señal de la proteína de la superficie celular *C. ammoniagenes* y la parte pro-estructural derivada de *S. cinnamoneum* IFO12852.

10 Se transformó *C. glutamicum* ATCC13869 con los plásmidos construidos pPKSPTG4 o pPKSPTG5, y se seleccionaron las cepas que crecían en el medio de agar CM2S arriba descrito que comprendía 25 mg/l de kanamicina. A continuación, se cultivó el *C. glutamicum* ATCC13869 seleccionado que hospedaba pPKSPTG4 o pPKSPTG5 en medio de cultivo MMTG, arriba descrito, que comprendía 25 mg/l de kanamicina a 30°C durante 30 días, respectivamente. Una vez terminada la incubación, se sometieron 10 µl del sobrenadante del cultivo a SDS-PAGE y se realizó luego un análisis por transferencia Western con anticuerpo anti-transglutaminasa como se ha descrito previamente de acuerdo con el método convencional. De este modo, se confirmó la secreción de la transglutaminasa derivada de *S. mobaraense* IFO13819 que tenía la parte pro-estructural derivada de *S. cinnamoneum* IFO12582. La Tabla 3 muestra la cantidad de la producción de pro-transglutaminasa. Se utilizó como control pPKSPTG1 y se caracterizó genéticamente en el sentido de que la pro-parte se derivaba de *S. mobaraense*. Se caracterizó pPKSPTG4 en la construcción genética en el sentido de que la pro-parte se derivaba de *S. cinnamoneum*. pPKSPTG5 se caracterizó en la construcción genética en el sentido de que la pro-estructura tenía una pro-estructura quimérica en la que los 16 aminoácidos del terminal N de la parte pro-estructural se derivaban de *S. mobaraense* y los 40 aminoácidos del terminal C se derivaban de *S. cinnamoneum*. Por lo demás, los 3 tenían las características comunes. Como resultado, se observó una diferencia significativa en la cantidad de secreción debido a la diferencia de la secuencia de aminoácidos de la parte pro-estructural. La cepa que tenía la estructura quimérica secretaba la cantidad máxima de transglutaminasa (ATCC13869/pPKSPTG5).

Tabla 3: Cantidad de la producción por secreción de pro-transglutaminasa debida a la diferencia de la parte pro-estructural

Plásmido	Protransglutaminasa mg/l
pPKSPTG1	235 mg/l
pPKSPTG4	130
pPKSPTG5	270

30 Ejemplo 8: Clonación del gen de serina-proteasa (SAMP45) y la generación y evaluación de los plásmidos de expresión

(1) Construcción del gen de serina-proteasa (SAMP45) que tiene la parte pro-estructural y la secuencia señal de la proteína de la superficie celular de *C. ammoniagenes* (gen de la prepro-serina proteasa (SAMP45) fusionado heterológamente).

35 La secuencia del gen de SAMP45 que es una serina proteasa producida por *S. albogriseolus* [J. Bacteriol., 179, 430-438 (1997)] ha sido ya determinada. Los iniciadores que se muestran en SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50 se sintetizaron recurriendo a esta secuencia y la región del gen que comprendía la parte proestructural del terminal N de SAMP45, SAMP45 maduro y la parte pro-estructural del terminal C se amplificó utilizando el método PCR de acuerdo con el método descrito anteriormente.

(SEQ ID NO: 49) 5'-AACGGGGAGAACAGCACGGCCGCCGG-3'

40 (SEQ ID NO: 50) 5'-GGCGAATTCTCCGGCGGGCCGTACCGGT-3'

<Texto libre del listado de secuencias>

SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50 : iniciadores PCR

45 La región que comprendía la región aguas arriba de 5' que contenía la región promotora del gen de la proteína de la superficie celular PS2 de *C. glutamicum* y la secuencia señal de la proteína de la superficie celular SipA de *C. ammoniagenes* se amplificó análogamente utilizando el método PCR con la combinación de SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 52 con pPKSPTG1 construido en el Ejemplo 4 (2) como molde.

El iniciador que se muestra en SEQ ID NO: 52 comprende la secuencia codificante de los aminoácidos del terminal N de pro-serina proteasa a fin de construir el gen de fusión que contenía la serina-proteasa que tenía la parte pro-estructural.

(SEQ ID NO: 51) 5'-GGCAAGCTTAAATTCCTGTGAATTAGCTGA-3'

5 (SEQ ID NO: 52)

5'-CGGCCGTGCTGTTCTCCCCGTTTGCCTTGCACAGGTGCGGCC-3'

< Texto libre del listado de secuencias >

SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 52: iniciadores PCR para construir el gen fusionado de la pro-serina proteasa

10 A continuación, el fragmento del gen de la prepro-serina proteasa fusionado heterológamente, que se había ligado a la secuencia señal de la proteína de la superficie celular SlpA de *C. ammoniagenes* y la región aguas arriba de 5' que contenía la región promotora del gen PS2, se amplificó por realización de PCR de entrecruzamiento con SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 50 utilizando como moldes la mezcla que comprendía 1 µl de solución PCR de la región amplificada que comprendía el gen para la parte pro-estructural del terminal N de SAMP45, SAMP45 madura y la pro-estructura del terminal C, y 1 µl de solución PCR de la región amplificada que comprendía la región aguas  
15 arriba de 5' que contenía la región promotora del gen PS2 y la secuencia señal de la proteína de la superficie celular SlpA de *C. ammoniagenes*, respectivamente.

El fragmento amplificado de aproximadamente 3,9 kb se detectó por electroforesis en agarosa.

20 El producto PCR se digirió con HindIII y EcoRI, se sometió luego a electroforesis en gel de agarosa, y el fragmento de aproximadamente 3,9 kb se recuperó del gel de agarosa y se insertó en el sitio HindIII-EcoRI del pVC7 arriba mencionado para obtener pVSS1, respectivamente. La secuencia del fragmento insertado se determinó de acuerdo con el método arriba mencionado y se confirmó que se había construido el gen de fusión como era de esperar.

(2) Secreción de la serina-proteasa utilizando la secuencia señal de la proteína de la superficie celular de *C. ammoniagenes*

25 Se transformó *C. glutamicum* ATCC13869 utilizando el plásmido pVSS1 y se seleccionaron las cepas que crecían en el medio de agar CM2S arriba descrito que comprendía 5 mg/l de cloranfenicol. El *C. glutamicum* ATCC13869 seleccionado que hospedaba pVSS1 se cultivó luego en medio de cultivo MMTG que comprendía 5 mg/l de cloranfenicol a 30°C durante 70 horas. Se separó 1 ml del medio de cultivo en el sobrenadante del medio de cultivo y las células por centrifugación. Las células se suspendieron en tampón de fosfato de sodio 0,1 M (pH 7,0). La actividad de la serina-proteasa se determinó como sigue: se añadieron 50 µl del sobrenadante del medio de cultivo o la suspensión  
30 de células a tampón de fosfato de sodio 20 mM (pH 7,0) que contenía Bz-Phe-Val-Arg-pNA 0,25 mM (Bachem Co. Ltd.) para dar una cantidad total de 0,6 ml, que se mantuvo a 30°C durante 20 minutos. Se terminó luego la reacción por adición de 0,4 ml de ácido acético al 50%. Se midió la absorbancia a 410 nm y se determinó la cantidad de p-NA (p-nitroanilida) liberada para determinar la actividad. Se definió una unidad de la enzima como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de pNA por minuto. Como resultado, no se detectaba la actividad de serina-proteasa en el sobrenadante del medio de cultivo, pero sí se detectaba en la suspensión de células. Calculando a partir de los valores de actividad detectada y los valores de la actividad específica consignada en la bibliografía [J. Bacteriol., 179, 430-438 (1997)], se confirmó que se expresaba tanto como aproximadamente 9 mg/l de serina-proteasa, y se secretaba en la superficie de la célula.

40 (3) Escisión de la parte pro-estructural de la transglutaminasa que tiene la parte pro-estructural por serina-proteasa que se produce por secreción en *C. glutamicum* ATCC13869

*C. glutamicum* ATCC13869 que hospedaba el plásmido de expresión por secreción pPKSPTG1 para la transglutaminasa que tiene la parte pro-estructural descrita en el Ejemplo 4 (2) se transformó con el plásmido construido pVSS1 y se seleccionaron las cepas que crecían en el medio de agar CM2S, arriba descrito, que comprendía 5 mg/l de cloranfenicol y 25 mg/l de kanamicina. A continuación, el *C. glutamicum* ATCC13869 seleccionado que hospedaba pVSS1 y pPKSPTG1 se cultivó en el medio de cultivo MMTG, arriba descrito, que comprendía 5 mg/l de cloranfenicol y 25 mg/ml de kanamicina a 30°C durante 70 horas. Una vez terminada la incubación, se sometieron 10 µl del sobrenadante del cultivo a SDS-PAGE y se realizó un análisis por transferencia Western con el anticuerpo anti-transglutaminasa descrito previamente de acuerdo con el método convencional. Como resultado, se confirmó que SAMP45 se expresaba y secretaba normalmente, y que la parte pro-estructural se escindía de la transglutaminasa  
45 que tenía la parte pro-estructural que se secreta también, dando como resultado la secreción de una transglutaminasa que tiene el peso molecular similar al de la transglutaminasa madura existente naturalmente.

50 El sobrenadante del medio de cultivo se investigó respecto a actividad de transglutaminasa por el método del hidroxamato descrito previamente, lo que confirmó que tenía una actividad específica similar (aproximadamente 20 U/mg) a la de la transglutaminasa existente naturalmente.

5 Se transfirió ulteriormente el mismo en condiciones semisecas sobre una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF) de acuerdo con el método descrito previamente después de la SDS-PAGE. Después de la transferencia, la membrana de PVDF se tiñó con Azul Brillante Coomassie, se destinó y se secó al aire. La porción que contenía la transglutaminasa madura se escindió y se analizó respecto a la secuencia de aminoácidos del terminal N utilizando un secuenciador de proteínas. Como resultado, se confirmó que la misma tenía una estructura en la cual los 4 aminoácidos del terminal C de Phe-Arg-Ala-Pro de la parte pro-estructural se añadían a la transglutaminasa madura existente naturalmente derivada de *S. mobaraense* que se muestra en SEQ ID NO: 5.

Ejemplo 9: Clonación del gen de la peptidasa específica de prolina (svPEP), y generación y evaluación de plásmidos de expresión

10 (1) Purificación de la peptidasa específica de prolina (svPEP) producida por *S. mobaraense* IFO13819

Se pusieron 800 ml de medio de cultivo líquido y SP2 (4 g de extracto de levadura, 10 g de extracto de malta, 4 g de glucosa completado hasta 1 l con agua, y ajustado a pH 7,3) en un matraz Sakaguchi de 5 l, se inoculó *S. mobaraense* IFO13819 desde la placa al matraz y se cultivó por agitación mediante sacudidas a 30°C durante 48 horas a 120 rpm.

15 Se centrifugó el medio de cultivo para eliminar el sobrenadante del cultivo y se cosecharon las células. Después de lavado de las células con tampón Tris-HCl 20 mM que contenía 25 mg/l de kanamicina, las células resultantes se suspendieron en tampón de fosfato de sodio 0,1 M (pH 7,0) que contenía 25 mg/ml de kanamicina. La suspensión se agitó mediante sacudidas en hielo durante 4 horas y se centrifugó para dar el sobrenadante, que se recogió. Después de esterilizar por filtración el sobrenadante utilizando un filtro de nitrocelulosa (0,22 µm de tamaño de poro, Sartrius Co. Ltd.), el sobrenadante se pasó a través de una columna Butil-Sepharose 4FF (Amersham Pharmacia Co. Ltd.) (1,6 ø x 10 cm), que se había pre-equilibrado con tampón de sulfato de amonio 1,5 M/ fosfato 50 mM (pH 7,0), utilizando FPLC (Amersham Pharmacia Co. Ltd.) y se eluyó con un gradiente lineal de sulfato de amonio 1,5 a 0 M en el mismo tampón. Las fracciones que contenían los componentes activos se agruparon y se pasaron a través de una columna de Fenil-Sepharose HP (1 ml, Amersham Pharmacia Co. Ltd.) en las mismas condiciones, y las fracciones activas se agruparon y se dializaron durante una noche contra tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH 7,0) a 4°C para dar una solución de enzima purificada parcialmente.

20 El peso total, la actividad total, la actividad específica y el rendimiento de proteínas en cada paso se presentan en la Tabla 4. La actividad enzimática en cada paso se determinó de acuerdo con el método de Yoshimoto et al (Tsuru y Funatsu compiladores, Seibutsukagaku Jikkenhou, 31 Proteolytic enzyme II, Gakkai Shuppan Center (1993), p. 187) como sigue:

25 La solución enzimática se añadió a 20 mM de tampón de fosfato de sodio que contenía 0,25 mM de Ala-Ala-Pro-pNA (Bachem Co. Ltd.) para dar una cantidad total de 0,6 ml, que se mantuvo a 30°C durante 5 minutos. Después de ello, se terminó la reacción por adición de 0,4 ml de ácido acético al 50%. Se midió la absorbancia a 410 nm y se calculó la cantidad de pNA liberada para determinar la actividad. Una unidad de la enzima se definió como la cantidad de la enzima que libera 1 µmol de pNA por minuto.

Tabla 4. Purificación de la peptidasa específica de prolina derivada de *S. mobaraense*

Pasos de Purificación	Volumen (ml)	Actividad total	Proteína total	Actividad específica	Rendimiento (%)	Nivel de purificación
Extracto bruto	550	308	385	0,80	100	1
Butil-Sepharose 4FF	45,6	213	8,98	23,7	69	30
Fenil-Sepharose HP	8	136	3,83	35,5	44	44

(2) Secuenciación de la secuencia amino del terminal N de la peptidasa específica de prolina (svPEP) producida por *S. mobaraense* IFO13819



pecto al terminal N. Se reveló también que la enzima no actuaba sobre el péptido que tenía prolina en la posición segunda o quinta respecto al terminal N (Tabla 5).

Tabla 5. Especificidad de svPEP

Sustrato peptídico	Actividad relativa
	(%)
p-pNA	0,04
DP-pNA	0,00
Z-GP-βNA	0,04
GP- βNA	0,40
AP- pNA	0,53
RP-pNA	0,94
Z-AGP-βNA	0,78
Z-GAP- βNA	1,2
Bz-FVR-pNA	0,002
AAF-pNA	4,1
AAA-pNA	8,5
AFP-pNA	26,3
AAP-pNA	100
AAPL-pNA	0,3
FRAP-pNA	49,0
Suc-AAPF-pNA	0,01
SFRAP-pNA	1,23
PSFRAP-pNA	0,2

5 pNA: p-nitroanilida, β-NA: β-naftilamido

<Texto libre del listado de secuencias>

SEQ ID NO: 68: sustrato para svPEP

(ii) pH óptimo

Se utilizaron como tampón, respectivamente

10 pH 4 a 6: tampón de fosfato de sodio 20 mM,

pH 5,5 a 8: tampón de fosfato de sodio 20 mM, y

pH 6,5 a 9,5: tampón tris-hidrocloruro 20 mM. La enzima se dejó actuar sobre Ala-Ala-Pro-pNA como el sustrato a 30°C durante 5 minutos. Se calculó la actividad relativa de la enzima en cada tampón comparando con la actividad tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 6,5 como 100%. Como resultado, se reveló que su pH óptimo estaba comprendido entre 6 y 6,5.

15

(iii) Estabilidad del pH

Se utilizaron tampones de GTA 0,15 M (tampones compuestos de ácido 3,3-dimetilglutámico, tris(hidroximetil)aminometano, 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol) comprendidos entre pH 3 y pH 10. A 20 µl de solución de enzima purificada, se añadieron 40 µl del tampón a cada pH y las mezclas de reacción se dejaron en reposo durante una noche a 4°C, se ajustaron luego a pH 7,0 y se completó el volumen hasta 120 µl. A partes alícuotas de 50 µl, se añadió Ala-Ala-Pro-pNA y la reacción se efectuó a 30°C durante 5 minutos. Se consideró que las cantidades relativas de sustrato que descomponían la enzima a cada pH eran la actividad restante comparada con la actividad de la enzima como 100% cuando la enzima se guardó en las mismas condiciones que se han descrito arriba excepto en lo que respecta a pH 7,0. Como resultado, se descubrió que la enzima era estable a pH 4 a 9.

20

25

## (iv) Temperatura óptima

5 A 50  $\mu$ l de solución purificada de enzima, se añadieron 0,5 ml de tampón de fosfato de sodio 20 mM (pH 6,5) y se añadió Ala-Ala-Pro-pNA hasta 0,25 mM, y la mixtura se mantuvo a 20°C-60°C durante 5 minutos para efectuar la reacción de descomposición. Se consideró que la cantidad relativa de sustrato que descomponía la enzima era la actividad relativa a cada temperatura, comparada con la cantidad de descomposición de sustrato a 25°C como 100% de actividad. Como resultado, se reveló que la temperatura óptima estaba comprendida entre 25 y 30°C.

## (v) Estabilidad de temperatura

10 A 50  $\mu$ l de solución de enzima purificada, se añadieron 0,5 ml de tampón de fosfato de sodio 20 mM (pH 6,5). La mixtura se mantuvo a 4°C o 20°C-60°C durante 15 minutos y se enfrió luego en hielo. Se añadió Ala-Ala-Pro-pNA hasta 0,25 mM, y la mixtura se mantuvo a 30°C durante 5 minutos. La actividad restante se calculó suponiendo que la actividad de la enzima que se trató a 4°C era 100%. Como resultado, se reveló que la enzima era estable por debajo de 20°C.

## (vi) Inhibidores

15 A tampón de fosfato de sodio 20 mM (pH 6,5) que contenía cada compuesto a la concentración indicada que se muestra en la Tabla 6, se añadió solución de enzima purificada y la mixtura se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadió luego Ala-Ala-Pro-pNA y se efectuó la reacción a 30°C durante 5 minutos. Suponiendo que la actividad de la enzima para Ala-Ala-Pro-pNA en la ausencia de compuestos es 100%, se consideró que la cantidad relativa de descomposición del sustrato en presencia del compuesto era la actividad relativa. Como resultado, se inhibió en cierto grado la enzima por medio de ácido cloromercuribenzoico, etc. que corresponde a los inhibidores enzimáticos SH, pero se sometió a inhibición comparativamente fuerte por fluoruro de fenilmetilsulfonilo (Nakaraitesk Co., Ltd.) y fluoruro de aminoetilbencenosulfonilo-clorhidrato (Boehringer Mannheim Co. Ltd.) que eran los inhibidores de la serina-proteasa.

20

Tabla 6. Efectos de los inhibidores respecto a la actividad de la peptidasa específica de prolina derivada de *S. mobaraense*

Compuestos	Concentración (mM)	Actividad relativa (%)
Ninguno	0	100
Inhibidores enzimáticos de serina		
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo	1	39,7
Fluoruro de aminoetilbencenosulfonilo-clorhidrato	4	59,9
Quimostatina	1	84,9
Inhibidores enzimáticos SH		
Ácido p-cloromercuribenzoico	1	87,1
N-Etilmaleimida	1	98,3
Yodoacetamida	1	87
Inhibidor enzimático de asparagina		
Pepstatina	1	165,7
Inhibidores de metaloproteasas		
EDTA	10	105,2
1,10-Fenantrolina	1	92,5
Inhibidor de aminopeptidasa		
Bestatina	1	97,6

Agente reductor		
Ditiotreitol	10	102,5
Inhibidores de prolil-endopeptidasa		
Z-(S)Pro-(S)Prolinal	1	111,2
Z-Pro-(S)Prolinal	1	105,8
Z-Pro-Prolinal	1	99,7

(3) Adquisición del gen de peptidasa específica de prolina (svPEP) derivado de *S. mobaraense* IFO13819

Se seleccionó la región que tenía menos degeneración, que se deduce de la secuencia de aminoácidos del terminal N determinada de svPEP, Lys-Ile-Pro-Gly-Met-Lys-Phe-Val-Glu-Glu-Lys, y se generó el oligonucleótido sintético que se muestra en SEQ ID NO: 54. El DNA cromosómico preparado de acuerdo con el método convencional se digirió con diversas enzimas de restricción que reconocen la secuencia de 6 nucleótidos y se analizó luego por el método de hibridación mediante transferencia Southern utilizando este oligonucleótido sintético como sonda y de este modo se detectó una sola banda de aproximadamente 6 kb por escisión con *SacI*. De acuerdo con ello, el DNA cromosómico de *S. mobaraense* IFO13819 preparado de acuerdo con el método arriba mencionado se digirió con *SacI* y se recuperó el fragmento de aproximadamente 6 kb utilizando electroforesis en gel de agarosa con EASYTRAP Ver. 2 (Takarashuzo Co. Ltd.). El fragmento recuperado se insertó en el sitio *SacI* de pUC18, que se introdujo en la célula competente de *Escherichia coli* JM109 (Takarashuzo Co. Ltd.), produciendo de este modo una biblioteca. La biblioteca así generada se cribó respecto a la cepa que hospedaba el plásmido en la cual se había clonado el fragmento de svPEP, por cribado de la biblioteca mediante hibridación de colonias utilizando como sonda el oligonucleótido sintético marcado con <sup>32</sup>P que se muestra en SEQ ID NO: 54 para obtener el gen propuesto. El plásmido recuperado de esta cepa se designó como pUMP1.

(SEQ ID NO: 54) 5'-AAGATCCCCGGGATGAAGTTCGTCGAGGAGAAG-3'

&lt;Texto libre del listado de secuencias&gt;

SEQ ID NO:54: sonda para svPEP

Se determinó la secuencia de nucleótidos del fragmento que se clonó como pUMP1. La secuencia de nucleótidos del gen svPEP correspondiente a svPEP se muestra en SEQ ID NO: 41. Se dedujo la secuencia de aminoácidos codificada por este gen y se encontró la secuencia de aminoácidos del terminal N determinada anteriormente (20 residuos) basada en la proteína enzimática, y se determinó la secuencia primaria de aminoácidos de la svPEP madura que se muestra en SEQ ID NO: 40. Se determinó la secuencia primaria entera de aminoácidos que contenía la secuencia señal supuesta y la parte pro-estructural de svPEP, que se muestra en SEQ ID NO: 42.

*Escherichia coli* AJ13669 que se transformó con pUMP1 ha sido depositado en el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana, Agencia de Ciencia y Tecnología Industrial en fecha 15 de mayo de 2000 como FERM BP-7160 de acuerdo con el tratado de Budapest.

(4) Construcción del gen de la peptidasa específica de prolina (svPEP) que tiene la parte pro-estructural con la secuencia señal de la proteína de la superficie celular de *C. ammoniagenes* (peptidasa específica pre-prolina fusionada heterológamente (svPEP)).

Los iniciadores que se muestran en SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 56 se sintetizaron recurriendo a la secuencia de svPEP determinada en el Ejemplo 9 (3), y la región del gen que contenía la pro-parte de svPEP y svPEP madura se amplificaron por el método PCR de la misma manera que se ha descrito anteriormente utilizando pUMP1 construido en el Ejemplo 9 (3) como molde.

(SEQ ID NO: 55) 5'-GAGGCGGCGTCGATCACCGCCCC-3'

(SEQ ID NO: 56) 5'-GCCAAGCTTGAAGCACCGGGCGGCGGCACCCGG-3'

&lt;Texto libre del listado de secuencias&gt;

SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 56: Iniciadores PCR

A continuación, se amplificó por el método PCR la región que comprende la región aguas arriba 5' que contiene la región promotora del gen PS2 que es el gen de la proteína de la superficie celular de *C. glutamicum* y la región que contiene la secuencia señal de la proteína de la superficie celular SIpA de *C. ammoniagenes*, a partir de pPKSPTG1 como molde construido en el Ejemplo 4 (2) utilizando la combinación de SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 57.

El iniciador que se muestra en SEQ ID NO: 57 comprende la secuencia codificante de los aminoácidos del terminal N de svPEP con objeto de construir el gen de fusión fusionado a la svPEP que tiene la parte pro-estructural.

(SEQ ID NO: 51) 5'-GGCAAGCTTAAATTCCTGTGAATTAGGCTGA-3'

(SEQ ID NO: 57)

5 5'-GGGGCGGTGATCGACGCCGCTCTGCCGTTGCCACAGGTGCGGCCA-3'

<Texto libre del listado de secuencias>

SEQ ID NO: 57: Iniciador PCR

10 El fragmento del gen fusionado heterológamente de prepro-svPEP, que estaba ligado a la secuencia señal de la proteína de la superficie celular SlpA de *C. ammoniagenes* y la región aguas arriba de 5' que contenía la región promotora del gen PS2, se amplificó luego por realización de PCR de entrecruzamiento con SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 56 utilizando como moldes la mixtura que comprendía 1 µl de cada solución PCR de la región que contenía el gen codificante de la parte pro-estructural de svPEP y la svPEP madura, que se amplificaron respectivamente, y 1 µl de solución PCR de la región amplificada que comprendía la región aguas arriba 5' que contenía la región promotora del gen PS2 y la secuencia señal de la proteína de la superficie celular SlpA de *C. ammoniagenes*.

15 (SEQ ID NO: 51) 5'-GGCAAGCTTAAATTCCTGTGAATTAGCTTA-3'

(SEQ ID NO: 56) 5'-GCCAAGCTTGAAGCACCGGCGGCGGCACCCGG-3'

20 El fragmento amplificado de aproximadamente 2,1 kb se detectó por electroforesis en agarosa. El fragmento PCR se digirió con HindIII, y se sometió luego a electroforesis en gel de agarosa, y el fragmento de aproximadamente 2,1 kb se recuperó del gel de agarosa y se insertó en el sitio HindIII del pVSS1 descrito en el Ejemplo 8 (1) para obtener pVSSSP1, respectivamente. La secuencia del fragmento insertado se determinó de acuerdo con el método convencional y se confirmó que se construía el gen de fusión esperado.

(5) Secreción de la peptidasa específica de prolina utilizando la secuencia señal de la proteína de la superficie celular de *C. ammoniagenes*

25 *C. glutamicum* ATCC 13869 se transformó con el plásmido pVSSSP1 construido y se seleccionaron las cepas que crecían en el medio de agar CMS2 arriba descrito que comprendía 5 mg/l de cloranfenicol. El *C. glutamicum* ATCC 13869 seleccionado que hospedaba pVSSSP1 se cultivó luego en medio de cultivo MMTG, arriba descrito, que comprendía 5 mg/l de cloranfenicol a 30°C durante 70 horas. Se separaron por centrifugación 10 µl del sobrenadante nte del cultivo en el sobrenadante del medio de cultivo y las células. Las células se suspendieron en tampón de fosfato de sodio 0,1 M (pH 7,0). La actividad de svPEP se determinó como sigue: se añadieron 5 µl del sobrenadante  
30 del medio de cultivo o la suspensión de células a 20 mM de tampón de fosfato de sodio (pH 7,0) que contenía Ala-Ala-Pro-pNA 0,25 mM (Bachem Co. Ltd.) para dar una cantidad total de 0,6 ml y la mixtura se mantuvo a 30°C durante 20 minutos. Después de ello se terminó la reacción por adición de 0,4 ml de ácido acético al 50%. Se midió la absorbancia a 410 nm y se calculó la cantidad de p-NA (p-nitroanilida) liberada para determinar la actividad. Una  
35 unidad de la enzima se define como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de pNA por minuto. Como resultado, la actividad de svPEP no se detectaba el sobrenadante del medio de cultivo, pero sí se detectaba en la suspensión de células. Calculando a partir de los valores de la actividad detectada y los valores de la actividad específica descritos en el Ejemplo 9 (1), se confirmó que se expresaba tanto como aproximadamente 50 mg/l de svPEP y se secretaba en la superficie de la célula.

40 (6) Escisión de la parte pro-estructural por la serina-proteasa y la proteasa específica de prolina expresada y secretada por *C. glutamicum* ATCC 13869.

45 *C. glutamicum* ATCC 13869 que hospedaba el plásmido de expresión por secreción pPKSPTG1 para transglutaminasa que tenía la parte pro-estructural descrita en el Ejemplo 4 (2) se transformó con el plásmido pVSSSP1 construido, y se seleccionaron las cepas que crecían en el medio de agar CM2S arriba descrito, que comprendía 5 mg/l de cloranfenicol y 25 mg/l de kanamicina. A continuación, el *C. glutamicum* ATCC 13869 seleccionado que hospedaba pVSSSP1 y pPKSPTG1 se cultivó en medio de cultivo MMTG, arriba descrito, que comprendía 5 mg/l de cloranfenicol y 25 mg/l de kanamicina a 30°C durante 70 horas. Una vez terminada la incubación, se sometieron 10 µl del sobrenadante del cultivo a SDS-PAGE y se realizó luego un análisis por transferencia Western con el anticuerpo anti-transglutaminasa descrito previamente de acuerdo con el método convencional. Como resultado, se confirmó  
50 que SAMP45 y svPEP se expresaban y secretaban normalmente, y que la parte pro-estructural se escindía de la transglutaminasa que tenía la parte pro-estructural que se había secretado también, con lo cual se confirmó la secreción de la transglutaminasa que tenía un peso molecular similar al de la transglutaminasa madura existente naturalmente.

La actividad de transglutaminasa del sobrenadante se testó por el método del hidroxamato descrito anteriormente, que confirmó que la misma tenía una actividad específica similar (aproximadamente 20 U/mg) a la de la transglutaminasa existente naturalmente.

5 Se transfirió luego el mismo en condiciones semisecas sobre una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF) de acuerdo con el método descrito previamente después de SDS-PAGE. Después de la transferencia, la membrana de PVDF se tiñó con Azul Coomassie Brillante, se destiñó y se secó al aire. Se separó la porción que contenía la transglutaminasa madura y se analizó respecto a la secuencia de aminoácidos del terminal N utilizando un secuenciador de proteínas. Como resultado, se confirmó que aquella tenía la misma secuencia que la transglutaminasa existente naturalmente derivada de *S. mobaraense* que tiene Asp como el aminoácido del terminal N, que se muestra en SEQ ID NO: 5.

Ejemplo 10: Generación de la variante de delección parcial de la pro-estructura de pro-transglutaminasa derivada de *S. mobaraense* IFO13819 y producción de transglutaminasa por secreción

(1) Construcción del gen para variantes de delección parcial de la pro-estructura de la transglutaminasa

15 Con objeto de generar la forma de delección parcial en la que se deleccionaron los residuos de aminoácidos del terminal C de la parte pro-estructural, se sintetizaron los iniciadores que se muestran en SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9 basándose en la secuencia del gen de transglutaminasa determinado en el Ejemplo 1 (1) y la región del gen de la transglutaminasa madura se amplificó utilizando pUITG obtenido en el Ejemplo 1 (1) por el método PCR similar al descrito previamente.

20 A continuación, la región del gen que comprendía la región aguas arriba 5' que contenía el promotor del gen PS2 que era la proteína de la superficie celular de *C. glutamicum*, la región del gen para la secuencia señal de la proteína de la superficie celular SlpA de *C. glutamicum* y la parte pro-estructural de la transglutaminasa se amplificó con la combinación de SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 58 o de SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 59, utilizando pPKSPTG1 construido en el Ejemplo 4 (2) como molde.

25 El iniciador que se muestra en SEQ ID NO: 58 tiene la secuencia que es deficiente en dos residuos de aminoácidos del terminal C, Ala-Pro, de la parte pro-estructural de la transglutaminasa, y el iniciador que se muestra en SEQ ID NO: 59 tiene la secuencia que es deficiente en los cuatro residuos de aminoácidos del terminal C, Phe-Arg-Ala-Pro, de la parte pro-estructural de la transglutaminasa y comprende adicionalmente la secuencia codificante de los residuos de aminoácidos del terminal N de la transglutaminasa madura a fin de construir el gen de fusión con transglutaminasa madura.

30 (SEQ ID NO: 14) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(SEQ ID NO: 58) 5'-GTG ACC CTG TCG TCG GAG TCC CGG AAC GAC GGG CGG GCG C-3'

(SEQ ID NO: 59) 5'-GTG ACC CTG TCG TCG GAG TCC GAC GGG CCG GCG CTC GAA G-3'

<Texto libre del listado de secuencias>

SEQ ID NO: 58 y SEQ ID NO: 59: Iniciadores PCR

35 El fragmento de gen para la transglutaminasa madura, que estaba ligado a la forma de delección de la pro-estructura de la transglutaminasa, la secuencia señal de la proteína de la superficie celular SlpA de *C. ammoniagenes* y la región aguas arriba 5' que contenía la región promotora del gen de PS2 que es la proteína de la superficie celular de *C. glutamicum*, se amplificó respectivamente utilizando PCR de entrecruzamiento con SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 9 utilizando como molde 1 µl de cada solución PCR que comprendía la región aguas arriba de 5' amplificada que contenía la región promotora del gen PS2 que es la proteína de la superficie celular de *C. glutamicum*, la secuencia señal de la proteína de la superficie celular SlpA de *C. ammoniagenes* y cada una de la parte pro-estructural modificada, y 1 µl de solución PCR de la región amplificada codificante de la transglutaminasa madura.

(SEQ ID NO: 14) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(SEQ ID NO: 9) 5'-CGCTCACATCACGGCCAGCCCTGCTTACC-3'

45 El fragmento amplificado de aproximadamente 1,8 kb se detectó por electroforesis en agarosa. El fragmento de aproximadamente 800 pb que se generó por digestión de este fragmento con las enzimas de restricción Scal y Eco065I se recuperó del gel de agarosa y se reemplazó por el fragmento escindido de pPKSPTG1, que se construyó en el Ejemplo 4 (2), con Scal y Eco065I para construir pPKSPTG1ΔAP (tipo de delección Ala -Pro) y pPKSPTG1ΔFRAP (tipo de delección Phe-Arg-Ala-Pro).

50 A continuación, con objeto de generar la forma de delección parcial de la pro-parte en donde los residuos de aminoácidos del terminal N de la parte pro-estructural se habían deleccionado parcialmente, se sintetizaron los iniciadores que se muestran en SEQ ID NO: 60 y SEQ ID NO: 61 basándose en la secuencia del gen de la transglutaminasa

determinada en el Ejemplo 1 (1) y las regiones del gen de transglutaminasa madura se amplificaron utilizando pUITG obtenido en el Ejemplo 1(1) por la misma PCR con la combinación de SEQ ID NO: 60 y SEQ ID NO: 9 o de SEQ ID NO: 61 y SEQ ID NO: 9.

(SEQ ID NO: 60) 5'-AAT GGC GCG GGG GAA GAG ACG AAG TCC TAC GCC GAA ACC T-3'

5 (SEQ ID NO: 61) 5'-GAG ACG AAG TCC TAC GCC GAA ACC TAC CGC CTC ACG GCG G-3'

(SEQ ID NO: 9) 5'-CGCTCACATCACGGCCAGCCCTGCTTTCC-3'

<Texto libre del listado de secuencias>

SEC ID NO: 50 y SEQ ID NO: 61 : Iniciadores PCR

10 A continuación, las regiones que comprendían la región aguas arriba 5' que contenía el promotor del gen de PS2 que era la proteína de la superficie celular de *C. glutamicum* y la región para la secuencia señal de la proteína de la superficie celular SlpA de *C. glutamicum* se amplificaron con la combinación de SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 62 o de SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 63, utilizando pPKSPTG1 construido en el Ejemplo 4 (2) como molde.

15 El iniciador que se muestra en SEQ ID NO: 62 tiene la secuencia deficiente del primer residuo de aminoácido Asp del terminal N, de la pro-parte de la transglutaminasa, el iniciador que se muestra en SEQ ID NO: 63 tiene la secuencia deficiente en los 6 residuos de aminoácidos Asp-Asn-Gly-Ala-Gly-Glu del terminal N, y los mismos comprenden adicionalmente la secuencia codificante de los residuos de aminoácidos del terminal C de la secuencia señal de la proteína de la superficie celular SlpA de *C. ammoniagenes* para construir el gen de fusión fusionado con la secuencia señal de la proteína SlpA de la superficie celular de *C. ammoniagenes*.

(SEQ ID NO: 14) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

20 (SEQ ID NO: 62) 5'-GTC TCT TCC CCC GCG CCA TTT GCC GTT GCC ACA GGT GCG G-3'

(SEQ ID NO: 63) 5'-TCG GCG TAG GAC TTC GTC TCT GCC GTT GCC ACA GGT GCG G-3'

<Texto libre del listado de secuencias>

SEQ ID NO: 62 y SEQ ID NO: 63 : Iniciadores PCR

25 El fragmento del gen de transglutaminasa maduro, que estaba ligado al tipo de delección parcial para la parte pro-estructural de la transglutaminasa, a la secuencia señal de la proteína de la superficie celular SlpA de *C. ammoniagenes* y también a la región aguas arriba 5' que contiene la región promotora del gen de PS2 que es la proteína de la superficie celular de *C. glutamicum*, se amplificó respectivamente utilizando PCR de entrecruzamiento con SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 9 utilizando como molde 1 µl de solución PCR para la región aguas arriba de 5' que contenía la región promotora del gen de PS2 que es la proteína de la superficie celular de *C. glutamicum* y la región codificante de la región que comprendía la secuencia señal de la proteína de la superficie celular SlpA de *C. ammoniagenes* y 1 µl de solución PCR de la región amplificada codificante de la pro-transglutaminasa en donde el terminal N de la parte pro-estructural se había deleccionado parcialmente, respectivamente.

(SEQ ID NO: 14) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(SEQ ID NO: 9) 5'-CGCTCACATCACGGCCAGCCCTGCTTTACC-3'

35 Los fragmentos amplificados de aproximadamente 1,8 kb se detectaron por electroforesis en agarosa. Los fragmentos de aproximadamente 800 pb que se generaron por digestión de estos fragmentos con las enzimas de restricción Scal y Eco065I se recuperaron del gel de agarosa y se reemplazaron por el fragmento escindido de pPKSPTG1 con Scal y Eco065I, que se construyó en el Ejemplo 4 (2), para construir pPKSPTG1ΔD1 (tipo de delección de Asp) y pPKSPTG1ΔDNGAGE (tipo de delección Asp-Asn-Gly-Ala-Gly-Glu).

40 (2) Secreción de la transglutaminasa que tiene la forma de delección parcial de la pro-estructura.

Se transformó *C. glutamicum* ATCC 13869 con el plásmido construido pPKSPTG1ΔD1, pPKSPTG1ΔD o pPKSPTG1ΔDNGAGE, y se seleccionaron las cepas que crecían en el medio de agar CM2S, arriba descrito, que comprendía 25 mg/l de kanamicina. El *C. glutamicum* ATCC 13869 seleccionado que hospedaba pPKSPTG1ΔAP, pPKSPTG1ΔFRAP, pPKSPTG1ΔD o pPKSPTG1ΔDNGAGE se cultivó luego en el medio de cultivo MMPG, arriba descrito, que comprendía 25 mg/l de kanamicina a 30°C durante 48 horas, respectivamente. Una vez terminada la incubación, se sometieron 10µl del sobrenadante del cultivo a SDS -PAGE y se realizó luego un análisis por transferencia Western con anticuerpo anti-transglutaminasa descrito anteriormente de acuerdo con el método convencional. Como resultado, se confirmó la secreción de la transglutaminasa en la cual se había deleccionado parcialmente la parte pro-estructural. El transformante que hospedaba pPKSPTG1ΔAP, pPKSPTG1ΔFRAP o pPKSPTG1ΔD exhibía una secreción equivalente a la de la forma existente naturalmente (pPKSPTG1), respectiva-

mente, pero el transformante que hospedaba pPKSPTG1ΔDNGAGE exhibió aproximadamente la mitad de secreción con relación a la de la forma existente naturalmente (pPKSPTG1).

(3) Escisión de la parte pro-estructural de la pro-transglutaminasa que tenía la forma de delección parcial de la pro-estructura por la serina-proteasa producida por secreción a partir de *C. glutamicum* ATCC 13869

5 *C. glutamicum* ATCC 13869 que hospedaba el plásmido de expresión por secreción pPKSPTG1 pPKSPTG1ΔFRAP, pPKSPTG1ΔD o pPKSPTG1ΔDNGAGE para la pro-transglutaminasa que tenía la forma de delección parcial de la pro-estructura, que se habían descrito en el Ejemplo 10 (2), se transformó con el plásmido pVSS1 construido en el Ejemplo 8 (1) y se seleccionaron las cepas que crecían en el medio de agar CM2S, arriba descrito, que comprendía 5 mg/l de cloranfenicol y 25 mg/ml de kanamicina. El *C. glutamicum* ATCC 13869 seleccionado que hospedaba pVSS1 y pPKSPTG1ΔAP, pPKSPTG1ΔFRAP, pPKSPTG1ΔD o pPKSPTG1ΔDNGAGE se cultivó luego en el medio de cultivo líquido MMTG, arriba descrito, que comprendía 5 mg/l de cloranfenicol y 25 mg/l de kanamicina a 30°C durante 70 horas. Una vez terminada la incubación, se sometieron 10μl del sobrenadante del cultivo a SDS-PAGE y se analizaron luego por transferencia Western con anticuerpo anti-transglutaminasa descrito previamente de acuerdo con el método convencional.

15 Como resultado, se confirmó que SAMP45 se expresaba y secretaba normalmente, y que la parte pro-estructural de la pro-transglutaminasa secretada análogamente que tenía la forma de delección parcial de la pro-estructura se escindía, dando como resultado la secreción de una transglutaminasa que tenía el peso molecular similar al de la transglutaminasa madura existente naturalmente.

20 Se realizó luego una transferencia semiseca sobre membrana PVDF después de SDS-PAGE, de acuerdo con el mismo método que se ha descrito previamente. Después de la transferencia, la membrana PVDF se tiñó con Azul Brillante Coomassie, se destiñó y se secó al aire. Las porciones que contenían la transglutaminasa madura se retiraron y se analizaron respecto a la secuencia de aminoácidos del terminal N utilizando un secuenciador de proteínas. Como resultado, se confirmó que se añadía Phe-Arg al terminal N de la transglutaminasa madura existente naturalmente que se muestra en SEQ ID NO: 5 en el transformante que hospedaba pPKSPTG1ΔAP, se añadía Ser -Ala-Gly-Pro-Ser al terminal N de la transglutaminasa madura existente naturalmente en el transformante que hospedaba pPKSPTG1ΔFRAP, y se añadía Phe-Arg-Ala-Pro a la transglutaminasa madura existente naturalmente en el transformante que hospedaba pPKSPTG1ΔD o pPKSPTG1ΔDNGAGE.

Ejemplo 11: Generación de las variantes para la parte pro-estructural de transglutaminasa derivada de *S. mobaraense* IFO13819 y producción por secreción de transglutaminasa

30 (1) Construcción de los genes de pro-transglutaminasa que tienen las variantes para la parte pro-estructural

Se sintetizaron los iniciadores que se muestran en SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9 basándose en la secuencia del gen de la transglutaminasa determinado en el Ejemplo 1 (1) y la región del gen de transglutaminasa madura se amplificó a partir de pUITG obtenido en el Ejemplo 1 (1) utilizando el método PCR.

35 A continuación, la región que comprende la región aguas arriba 5' que contiene el promotor del gen de PS2 que era la proteína de la superficie celular de *C. glutamicum*, la región del gen de la secuencia señal de la proteína de la superficie celular SlpA de *C. glutamicum* y la parte pro-estructural de transglutaminasa, se amplificó utilizando el método PCR con la combinación de SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 64, o de SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 65, o de SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 66, o de SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 67 utilizando pPKSPTG1 construido en el Ejemplo 4 (2) como molde.

40 El iniciador que se muestra en SEQ ID NO: 64 comprende la secuencia génica en la que los residuos de 3 aminoácidos del terminal C de la parte pro-estructural de transglutaminasa, Arg-Ala-Pro se convirtieron en Gly-Pro-Lys, el iniciador que se muestra en SEQ ID NO: 65 comprende la secuencia génica en la cual los residuos de 3 aminoácidos del terminal C de la parte pro-estructural de transglutaminasa, Arg-Ala-Pro, se convirtieron en Gly-Pro-Arg, el iniciador que se muestra en SEQ ID NO: 66 comprende la secuencia génica en la cual los residuos de 5 aminoácidos del terminal C de la parte pro-estructural de transglutaminasa, Ser-Phe-Arg-Ala-Pro se convirtieron en sólo Lys, y el iniciador que se muestra en SEQ ID NO: 67 comprende la secuencia génica en la cual Ser-Phe-Arg-Ala-Pro se convirtieron solamente en Arg.

Adicionalmente, los mismos comprenden la secuencia codificante de los residuos de aminoácidos del terminal N de transglutaminasa madura a fin de construir el gen de fusión fusionado con transglutaminasa madura

50 (SEQ ID NO: 14) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(SEQ ID NO: 64) 5'-GTG ACC CTG TCG TCG GAG TCC TGG CCG AAC GAC GGG C-3'

(SEQ ID NO: 65) 5'-GTG ACC CTG TCG TCG GAG TCG CGG GGG CCG AAC GAC GGG C G-3'

(SEQ ID NO: 66) 5'-GTG ACC CTG TCG TCG GAG TCC TCC GGG CCG GCG CTC GAA G-3'

(SEQ ID NO: 67) 5'-GTG ACC CTG TCG TCG GAG TCG CGC GGG CGG GCG CTC GAA G-3'

<Texto libre del listado de secuencias>

SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66 y SEQ ID NO: 67 : Iniciadores PCR

5 Los fragmentos del gen de transglutaminasa, que se ligaron a la parte pro-estructural modificada de la transglutaminasa que tenía la pro-estructura modificada, la secuencia señal de la proteína de la superficie celular SlpASlpA de *C. ammoniagenes* y la región aguas arriba 5' que contenía la región promotora del gen de PS2 que es la proteína de la superficie celular de *C. glutamicum*, se amplificó por PCR de entrecruzamiento con SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 9 utilizando 1 µl de solución PCR de la región respectivamente amplificada que comprendía los genes codificantes de la región aguas arriba 5' que comprende la región promotora del gen de PS2 que es la proteína de la superficie celular de *C. glutamicum*, la secuencia señal de la proteína de la superficie celular SlpASlpA de *C. ammoniagenes*, y la región codificante de la región que contiene la parte pro-estructural modificada, y 1 µl de solución PCR de la región amplificada codificante de la transglutaminasa madura.

(SEQ ID NO: 14) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(SEQ ID NO: 9) 5'-CGCTCACATCACGGCCAGCCCTGCTTTACC-3'

15 Los fragmentos amplificados de aproximadamente 1,8 kb se detectaron por electroforesis en agarosa. Los fragmentos de aproximadamente 800 pb, que se generaron por digestión de estos fragmentos con las enzimas de restricción *ScaI* y *Eco065I*, se recuperaron del gel de agarosa y se reemplazaron por el fragmento escindido de pPKSPTG1 construido en el Ejemplo 4(2) con *SacI* y *Eco065I* para construir pPKSPTG11 (variante modificada de tipo Gly-Pro-Lys) y pPKSPTG12 (variante modificada de tipo Gly-Pro-Arg), pPKSPTG13 (variante de tipo ΔPhe-Arg-Ala-Pro y de inserción Lys) y pPKSPTG14 (variante de tipo ΔPhe-Arg-Ala-Pro Y DE inserción Arg).

(2) Secreción de la transglutaminasa en la forma de la parte pro-estructural modificada

25 Se transformó *C. glutamicum* ATCC 13869 con los plásmidos construidos pPKSPTG11, pPKSPTG12, pPKSPTG13 o pPKSPTG14 y se seleccionaron las cepas que crecían en el medio de agar CM2S, arriba descritas, que comprendía 25 mg/l de kanamicina. A continuación, el *C. glutamicum* ATCC 13869 seleccionado que hospedaba pPKSPTG11, pPKSPTG12, pPKSPTG13 o pPKSPTG14 se cultivó en medio de cultivo MMTG, arriba descrito, que comprendía 25 mg/l de kanamicina a 30°C durante 48 horas, respectivamente. Una vez terminada la incubación, se sometieron 10 µl del sobrenadante del cultivo a SDS-PAGE y luego se realizó un análisis por transferencia Western con el anticuerpo anti-transglutaminasa descrito previamente de acuerdo con el método convencional. Como resultado, se confirmó la secreción de la transglutaminasa que tenía la parte pro-estructural.

30 (3) Escisión de la parte pro-estructural de la transglutaminasa que tiene la variante de la parte pro-estructural con serina-proteasa producida mediante producción por secreción por secreción a partir de *C. glutamicum* ATCC 13869

35 *C. glutamicum* ATCC 13869 que hospedaba el plásmido de expresión secretor pPKSPTG11, pPKSPTG12, pPKSPTG13 o pPKSPTG14 para la transglutaminasa que tenía la variante de la parte pro-estructural, que se describió en el Ejemplo 11 (2), se transformó con el plásmido pVSS1 construido en el Ejemplo 8 (1) y se seleccionaron las cepas que crecían en el medio de agar CM2S, arriba descrito, que comprendía 5 mg/l de cloranfenicol y 25 mg/l de kanamicina. El *C. glutamicum* ATCC 13869 seleccionado que hospedaba pVSS1 y pPKSPTG11, pVSS1 y pPKSPTG12, pVSS1 y pPKSPTG13 o pVSS1 y pPKSPTG14 se cultivó luego en el medio de cultivo líquido MMTG, arriba descrito, que comprendía 5 mg/l de cloranfenicol y 25 mg/l de kanamicina a 30°C durante 70 horas. Una vez terminada la incubación, se sometieron 10 µl del sobrenadante del cultivo a SDS-PAGE y se realizó a continuación un análisis por transferencia Western con anticuerpo anti-transglutaminasa descrito previamente de acuerdo con el método convencional. Como resultado, se confirmó que SAMP45 se expresaba y secretaba normalmente, se confirmó que la variante pro-estructural de la transglutaminasa que tenía la variante pro-estructural, que se había secretado también, se escindía, y se confirmó por consiguiente la secreción de transglutaminasa que tenía un peso molecular similar al de la transglutaminasa madura existente naturalmente.

45 Se realizó luego una transferencia semiseca sobre membrana de PVDF de acuerdo con el mismo método que se ha descrito previamente después de la SDS-PAGE. Después de la transferencia, la membrana PVDF se tiñó con Azul Brillante Coomassie, se destiñó y se secó al aire. Las porciones que contenían transglutaminasa madura se escindieron y se analizaron respecto a la secuencia de aminoácidos del terminal N utilizando un secuenciador de proteínas. Como resultado, se confirmó una secuencia idéntica a la de la transglutaminasa madura existente naturalmente para *C. glutamicum* ATCC 13869 que hospedaba pVSS1 y pPKSPTG11, o pVSS1 y pPKSPTG12, que tenían Asp en el residuo de aminoácido del terminal N. En contraste, se encontró que se había añadido la secuencia en la que Ser-Ala-Gly-Pro-Lys (SEQ ID NO: 69) o Ser-Ala-Gly-Pro-Arg (SEQ ID NO: 70) a la secuencia de la transglutaminasa madura existente naturalmente para *C. glutamicum* ATCC 13869 que hospedaba pVSS1 y pPKSPTG13, o pVSS1 y pPKSPTG14.

Se determinó la actividad de transglutaminasa para el sobrenadante del medio de cultivo del primero, que exhibía la misma secuencia de aminoácidos que la de la transglutaminasa madura existente naturalmente, lo que confirmó que ambos tenían prácticamente la misma actividad específica (aproximadamente 20 U/mg) que la de la transglutaminasa existente naturalmente, como se determinó por el método del hidroxamato descrito anteriormente.

5 <Texto libre del listado de secuencias>

SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70: secuencia añadida a la secuencia de la transglutaminasa existente naturalmente

De acuerdo con la presente invención, es posible hacer que una bacteria corineforme produzca y secrete extracelularmente una gran cantidad de una proteína transglutaminasa útil. Dado que la proteína producida de acuerdo con la presente invención se libera al medio de cultivo, la proteína puede recuperarse directamente del medio de cultivo de modo más simple y en mayor escala por métodos conocidos apropiados.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Ajinomoto Co., Inc.

15

<120> Un método para producir transglutaminasa

<130> Y1H0862

<140>

<141>

20

<150> JP 11-280098

<151> 30-09-1999

<150> JP 2000-194043

25

<151> 28-06-2000

<160> 70

<170> PatentIn Ver. 2.1

30

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

35

<400> 1

Met Phe Asn Asn Arg Ile Arg Thr Ala Ala Leu Ala Gly Ala Ile Ala

1 5 10 15

Ile Ser Thr Ala Ala Ser Gly Val Ala Ile Pro Ala Phe Ala

20 25 30

<210> 2

<211> 25

5 <212> PRT

<213> Corynebacterium ammoniagenes

<400> 2

Met Lys Arg Met Lys Ser Leu Ala Ala Ala Leu Thr Val Ala Gly Ala

1 5 10 15

Met Leu Ala Ala Pro Val Ala Thr Ala

20 25

10 <210> 3

<211> 45

<212> PRT

<213> Streptovercillium mobaraense

15 <400> 3

Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg

1 5 10 15

Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala

20 25 30

Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Arg Ala Pro

35 40 45

<210> 4

<211> 54

<212> PRT

<213> Streptovercillium cinnamoneum

5

<400> 4

Gly Asp Gly Glu Glu Lys Gly Ser Tyr Ala Glu Thr His Gly Leu Thr

1 5 10 15

Ala Asp Asp Val Glu Ser Ile Asn Ala Leu Asn Glu Arg Ala Leu Thr

20 25 30

Leu Gly Gln Pro Gly Lys Pro Pro Lys Glu Leu Pro Pro Ser Ala Ser

35 40 45

Ala Pro Ser Arg Ala Pro

50

<210> 5

10 <211> 331

<212> PRT

<213> Streptovercillium mobaraense

<400> 5

Asp Ser Asp Asp Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met  
 1                      5                      10                      15

Pro Asp Pro Tyr Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu Thr Val Val Asn  
                     20                      25                      30

Asn Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Arg  
                     35                      40                      45

Lys Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu Ser Tyr Gly Cys  
                     50                      55                      60

Val Gly Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Thr Asn Arg Leu  
 65                      70                      75                      80

Ala Phe Ala Ser Phe Asp Glu Asp Arg Phe Lys Asn Glu Leu Lys Asn  
                     85                      90                      95

Gly Arg Pro Arg Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Val  
                     100                      105                      110

Ala Lys Glu Ser Phe Asp Glu Glu Lys Gly Phe Gln Arg Ala Arg Glu  
                     115                      120                      125

Val Ala Ser Val Met Asn Arg Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Ser  
 130                      135                      140

Ala Tyr Leu Asp Asn Leu Lys Lys Glu Leu Ala Asn Gly Asn Asp Ala

ES 2 372 806 T3

145	150	155	160
Leu Arg Asn Glu Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn			
	165	170	175
Thr Pro Ser Phe Lys Glu Arg Asn Gly Gly Asn His Asp Pro Ser Arg			
	180	185	190
Met Lys Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Arg			
	195	200	205
Ser Ser Ser Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Asp Ala Phe Arg			
	210	215	220
Pro Ala Pro Gly Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Arg Asp Arg Asn Ile			
225	230	235	240
Pro Arg Ser Pro Thr Ser Pro Gly Glu Gly Phe Val Asn Phe Asp Tyr			
	245	250	255
Gly Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Val Trp			
	260	265	270
Thr His Gly Asn His Tyr His Ala Pro Asn Gly Ser Leu Gly Ala Met			
	275	280	285
His Val Tyr Glu Ser Lys Phe Arg Asn Trp Ser Glu Gly Tyr Ser Asp			
	290	295	300



aggtttgaag cattttctcc gattgcctg gcaaaaatct caattgtcgc ttacagtttt 420

tctcaacgac aggctgctaa gctgctagtt cgggtggccta gtgagtggcg tttacttga 480

taaaagtaat cccatgtcgt gatcagccat tttgggttgt ttccatagca atccaaaggt 540

ttcgtctttc gataacctatt caaggagcct tcgctctct atg ttt aac aac cgt atc 596

Met Phe Asn Asn Arg Ile

1

5

cgc act gca gct ctc gct ggt gca atc gca atc tcc acc gca gct tcc 644

Arg Thr Ala Ala Leu Ala Gly Ala Ile Ala Ile Ser Thr Ala Ala Ser

10

15

20

ggc gta gct atc cca gca ttc gct cag gag acc aac cca acc ttc aac 692

Gly Val Ala Ile Pro Ala Phe Ala Gln Glu Thr Asn Pro Thr Phe Asn

25

30

35

atc aac aac ggc ttc aac gat gct gat gga tcc acc atc cag cca gtt 740

Ile Asn Asn Gly Phe Asn Asp Ala Asp Gly Ser Thr Ile Gln Pro Val

40

45

50

gag cca gtt aac cac acc gag gaa acc ctc cgc gac ctg act 782

Glu Pro Val Asn His Thr Glu Glu Thr Leu Arg Asp Leu Thr

55

60

65

<210> 7

<211> 68

5 <212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 7

Met Phe Asn Asn Arg Ile Arg Thr Ala Ala Leu Ala Gly Ala Ile Ala  
1 5 10 15

Ile Ser Thr Ala Ala Ser Gly Val Ala Ile Pro Ala Phe Ala Gln Glu  
20 25 30

Thr Asn Pro Thr Phe Asn Ile Asn Asn Gly Phe Asn Asp Ala Asp Gly  
35 40 45

Ser Thr Ile Gln Pro Val Glu Pro Val Asn His Thr Glu Glu Thr Leu  
50 55 60

Arg Asp Leu Thr  
65

<210> 8

<211> 30

5 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

10

<400> 8

gactccgacg acagggtcac ccctcccgcc 30

<210> 9

15 <211> 30

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 9

cgctcacatc acggccagcc ctgctttacc 30

5 <210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 10

gtgaccctgt cgtcggagtc 20

15

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 11

25 ggcatcctgt cgagcggctc 20

<210>12

<211> 1809

<212> DNA

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

35 <220>

<221> CDS

ES 2 372 806 T3

<222> (578)..(1798)

<400> 12

gtcgacgagg gccgggaggg ggtgcggcgg cgccttcgg ctgtgtggac gaagcgtcgg 60

gtcggagggg cggccggata tcgtccttgg ggcggggtgg ccggaattgc cgccatggtg 120

ttcggggga atcgaccga agacatgatc acttctcgtg tccaccgat cacgtatccg 180

5

ggagtcgaga agtgttacgc cgtgccctg tccggtcct caccctgtc gccgtgacag 240  
 cgacccgcgt tcttccactc gcacggacgg cccacagga ctttctggcc cgggtcgc 300  
 ccgcccctc ggtgacggcc tccgaataac gggccgccc gggcctcggc cggttgaccg 360  
 atccgggtca cgcgccccgc cgggcgggcg gccacgtccg gtctcgcgcc gcccgacatc 420  
 ggctgcgact gccttcctc gcacttctc ccgctcccg gcccggtttt tccgcccgcg 480  
 aaggtgcggc gacgcgtacc gaatccccct tcctcgcgac gtgcttcgcg acggccgcgt 540  
 tcaacgatgt tccacgacaa aggagttgca ggtttcc atg cgc ata cgc cgg aga 595  
 Met Arg Ile Arg Arg Arg  
 1 5  
 gct ctc gtc ttc gcc act atg agt gcg gtg tta tgc acc gcc gga ttc 643  
 Ala Leu Val Phe Ala Thr Met Ser Ala Val Leu Cys Thr Ala Gly Phe  
 10 15 20  
 atg ccg tcg gcc ggc gag gcc gcc gcc gac aat ggc gcg ggg gaa gag 691  
 Met Pro Ser Ala Gly Glu Ala Ala Ala Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu  
 25 30 35  
 acg aag tcc tac gcc gaa acc tac cgc ctc acg gcg gat gac gtc gcg 739  
 Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala  
 40 45 50

ES 2 372 806 T3

aac atc aac gcg ctc aac gaa agc gct ccg gcc gct tcg agc gcc ggc 787  
Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly  
55 60 65 70

ccg tcg ttc cgg gcc ccc gac tcc gac gac agg gtc acc cct ccc gcc 835  
Pro Ser Phe Arg Ala Pro Asp Ser Asp Asp Arg Val Thr Pro Pro Ala  
75 80 85

gag ccg ctc gac agg atg ccc gac ccg tac cgt ccc tcg tac ggc agg 883  
Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Asp Pro Tyr Arg Pro Ser Tyr Gly Arg  
90 95 100

gcc gag acg gtc gtc aac aac tac ata cgc aag tgg cag cag gtc tac 931  
Ala Glu Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr  
105 110 115

agc cac cgc gac ggc agg aag cag cag atg acc gag gag cag cgg gag 979  
Ser His Arg Asp Gly Arg Lys Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu  
120 125 130

tgg ctg tcc tac ggc tgc gtc ggt gtc acc tgg gtc aat tcg ggt cag 1027  
Trp Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Gln  
135 140 145 150

tac ccg acg aac aga ctg gcc ttc gcg tcc ttc gac gag gac agg ttc 1075  
Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Ser Phe Asp Glu Asp Arg Phe  
155 160 165

aag aac gag ctg aag aac ggc agg ccc cgg tcc ggc gag acg cgg gcc 1123

Lys Asn Glu Leu Lys Asn Gly Arg Pro Arg Ser Gly Glu Thr Arg Ala	
170	175
180	
gag ttc gag ggc cgc gtc gcg aag gag agc ttc gac gag gag aag ggc	1171
Glu Phe Glu Gly Arg Val Ala Lys Glu Ser Phe Asp Glu Glu Lys Gly	
185	190
195	
ttc cag cgg gcg cgt gag gtg gcg tcc gtc atg aac agg gcc ctg gag	1219
Phe Gln Arg Ala Arg Glu Val Ala Ser Val Met Asn Arg Ala Leu Glu	
200	205
210	
aac gcc cac gac gag agc gct tac ctc gac aac ctc aag aag gaa ctg	1267
Asn Ala His Asp Glu Ser Ala Tyr Leu Asp Asn Leu Lys Lys Glu Leu	
215	220
225	230
gcg aac ggc aac gac gcc ctg cgc aac gag gac gcc cgt tcc ceg ttc	1315
Ala Asn Gly Asn Asp Ala Leu Arg Asn Glu Asp Ala Arg Ser Pro Phe	
235	240
245	
tac tcg gcg ctg cgg aac acg ccg tcc ttc aag gag cgg aac gga ggc	1363
Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe Lys Glu Arg Asn Gly Gly	
250	255
260	
aat cac gac ccg tcc agg atg aag gcc gtc atc tac tcg aag cac ttc	1411
Asn His Asp Pro Ser Arg Met Lys Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe	
265	270
275	
tgg agc ggc cag gac cgg tcg agt tcg gcc gac aag agg aag tac ggc	1459
Trp Ser Gly Gln Asp Arg Ser Ser Ser Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Gly	

ES 2 372 806 T3

280	285	290	
gac ccg gac gcc ttc cgc ccc gcc ccg ggc acc ggc ctg gtc gac atg			1507
Asp Pro Asp Ala Phe Arg Pro Ala Pro Gly Thr Gly Leu Val Asp Met			
295	300	305	310
tcg agg gac agg aac att ccg cgc agc ccc acc agc ccc ggt gag gga			1555
Ser Arg Asp Arg Asn Ile Pro Arg Ser Pro Thr Ser Pro Gly Glu Gly			
315	320	325	
ttc gtc aat ttc gac tac ggc tgg ttc ggc gcc cag acg gaa gcg gac			1603
Phe Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp			
330	335	340	
gcc gac aag acc gtc tgg acc cac gga aat cac tat cac gcg ccc aat			1651
Ala Asp Lys Thr Val Trp Thr His Gly Asn His Tyr His Ala Pro Asn			
345	350	355	
ggc agc ctg ggt gcc atg cat gtc tac gag agc aag ttc cgc aac tgg			1699
Gly Ser Leu Gly Ala Met His Val Tyr Glu Ser Lys Phe Arg Asn Trp			
360	365	370	
tcc gag ggt tac tcg gac ttc gac cgc gga gcc tat gtg atc acc ttc			1747
Ser Glu Gly Tyr Ser Asp Phe Asp Arg Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe			
375	380	385	390
atc ccc aag agc tgg aac acc gcc ccc gac aag gta aag cag ggc tgg			1795
Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro Asp Lys Val Lys Gln Gly Trp			
395	400	405	
ccg tgatgtgagc g			1809
Pro			

ES 2 372 806 T3

<210> 13

<211> 407

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 13

Met Arg Ile Arg Arg Arg Ala Leu Val Phe Ala Thr Met Ser Ala Val

1 5 10 15

Leu Cys Thr Ala Gly Phe Met Pro Ser Ala Gly Glu Ala Ala Ala Asp

20 25 30

Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg Leu

35 40 45

Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala Pro

50 55 60

Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Arg Ala Pro Asp Ser Asp Asp

65 70 75 80

Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Asp Pro Tyr

85 90 95

ES 2 372 806 T3

Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile Arg  
100 105 110

Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Arg Lys Gln Gln Met  
115 120 125

Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr  
130 135 140

Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Ser  
145 150 155 160

Phe Asp Glu Asp Arg Phe Lys Asn Glu Leu Lys Asn Gly Arg Pro Arg  
165 170 175

Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Val Ala Lys Glu Ser  
180 185 190

Phe Asp Glu Glu Lys Gly Phe Gln Arg Ala Arg Glu Val Ala Ser Val  
195 200 205

Met Asn Arg Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Ser Ala Tyr Leu Asp  
210 215 220

Asn Leu Lys Lys Glu Leu Ala Asn Gly Asn Asp Ala Leu Arg Asn Glu  
225 230 235 240

Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe

	245		250		255
Lys Glu Arg Asn Gly Gly Asn His Asp Pro Ser Arg Met Lys Ala Val					
	260		265		270
Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Arg Ser Ser Ser Ala					
	275		280		285
Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Asp Ala Phe Arg Pro Ala Pro Gly					
	290		295		300
Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Arg Asp Arg Asn Ile Pro Arg Ser Pro					
305		310		315	320
Thr Ser Pro Gly Glu Gly Phe Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Gly					
	325		330		335
Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Val Trp Thr His Gly Asn					
	340		345		350
His Tyr His Ala Pro Asn Gly Ser Leu Gly Ala Met His Val Tyr Glu					
	355		360		365
Ser Lys Phe Arg Asn Trp Ser Glu Gly Tyr Ser Asp Phe Asp Arg Gly					
	370		375		380
Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro Asp					
385		390		395	400

Lys Val Lys Gln Gly Trp Pro

405

<210> 14

<211> 26

5 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

10

<400> 14

aaattcctgt gaattagctg atttag 26

<210> 15

15 <211> 44

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 15

gagctctccg gcgtatgcdc atagaggcga aggctccttg aata 44

25 <210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 16

atgcgcatag gccggagagc tctcgtcttc 30

<210> 17

<211> 47

<212> DNA

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

10 <400> 17

ggggtgacct tgcgtcgga gtcgtgaag ccgtgttga tgtgaa 47

<210> 18

<211> 51

15 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

20

<400> 18

cttcgtctct tccccgcgc cattgtcagc gaatgctggg atagcaacgc c 51

<210> 19

25 <211> 51

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 19

cttcgtctct tccccgcgc cattgtcctg agcgaatgct gggatagcta c 51

35 <210> 20

<211> 51

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 20

cttcgtctct tccccgcgc cattgtcgtt gaagccgttg ttgatgtga a 51

10 <210> 21

<211> 51

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 21

cttcgtctct tccccgcgc cattgtcagt caggtcgcgg agggtttct c 51

20

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial :PCR primer

<400> 22

30 gacaatggcg cgggggaaga gacgaagtcc 30

<210> 23

<211> 25

<212> DNA

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 23

5 gcccagaagc ccaaaattga gattt 25

<210> 24

<211> 52

<212> DNA

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

15 <400> 24

cttctgtctct tccccgcgc cattgtctgc cgttgccaca ggtgcggcca gc 52

<210> 25

<211> 52

20 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

25

<400> 25

cgcagccagc gatttcagc gttcataga ggccaaggct cctgaatag gt 52

<210> 26

30 <211> 30

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 26

atgaaacgca tgaatcgct ggctgcggcg 30

<210> 27

5 <211> 25

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 27

ggatccggag cttatcgact gcacg 25

15 <210> 28

<211> 52

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 28

cgcagccagc gatttcatgc gtttcataat tctgttcct gtgtgaaatt gt 52

25

<210> 29

<211> 43

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

30

<400> 29

Met Arg Asp Thr Ala Phe Arg Ser Ile Lys Ala Lys Ala Gln Ala Lys  
1 5 10 15

Arg Arg Ser Leu Trp Ile Ala Ala Gly Ala Val Pro Thr Ala Ile Ala  
20 25 30

Leu Thr Met Ser Leu Ala Pro Met Ala Ser Ala  
35 40

<210> 30

<211> 43

5 <212> PRT

<213> Streptovercillium mobaraense

<400> 30

Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg  
1 5 10 15

Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala  
20 25 30

Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Arg  
35 40

10

<210> 31

<211> 41

<212> PRT

<213> Streptovercillium mobaraense

15

<400> 31

Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg

1 5 10 15

Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala

20 25 30

Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser

35 40

<210> 32

<211> 44

5 <212> PRT

<213> Streptovercillium mobaraense

<400> 32

Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg Leu

1 5 10 15

Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala Pro

20 25 30

Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Arg Ala Pro

35 40

10

<210> 33

<211> 39

<212> PRT

<213> Streptovercillium mobaraense

15

<400> 33

Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg Leu Thr Ala Asp Asp Val

1 5 10 15

Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala Pro Ala Ala Ser Ser Ala

20 25 30

Gly Pro Ser Phe Arg Ala Pro

35

<210> 34

5 <211> 45

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: pro-región modificada de transglutaminasa de Streptovercillium mobaraense

<400> 34

Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg

1 5 10 15

Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala

20 25 30

Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Gly Pro Lys

35 40 45

15

<210> 35

<211> 45

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Descripción de Secuencia Artificial: pro-región modificada de transglutaminasa de Streptovercillium mobaraense

<400> 35

Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg  
1 5 10 15

Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala  
20 25 30

Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Gly Pro Arg  
35 40 45

10 <210> 36

<211> 41

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: pro-región modificada de transglutaminasa de Streptovercillium mobaraense

<400> 36

Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg

20

ES 2 372 806 T3

1 5 10 15

Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala  
20 25 30

Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Lys  
35 40

<210> 37

<211> 41

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: pro-región modificada de transglutaminasa de Streptovercillium mobaraense

<400> 37

Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg  
1 5 10 15

Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala  
20 25 30

Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Arg  
35 40

15 <210> 38

<211> 56

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial:pro-región quimera de transglutaminasa de Streptovercillium mobaraence y Streotpvtercillium cinnamoneum

5

<400> 38

Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg  
1                    5                    10                    15

Leu Thr Ala Asp Asp Val Glu Ser Ile Asn Ala Leu Asn Glu Arg Ala  
                  20                    25                    30

Leu Thr Leu Gly Gln Pro Gly Lys Pro Pro Lys Glu Leu Pro Pro Ser  
                  35                    40                    45

Ala Ser Ala Pro Ser Arg Ala Pro  
                  50                    55

<210> 39

10 <211> 1079

<212> PRT

<213> Streptomyces albogriseolus

<400> 39

ES 2 372 806 T3

Asn Gly Glu Asn Ser Thr Ala Ala Gly Ser Ser Ala Ser Ala Thr Ala  
1                    5                    10                    15

Leu Lys Gly Lys His Arg Val Thr Leu Ile Thr Gly Asp Arg Val Ala  
                  20                    25                    30

Leu Asp Ala Lys Gly Arg Val Val Gly Leu Glu Pro Ala Glu Gly Arg  
                  35                    40                    45

Glu His Ile Pro Val Gln Ile Arg Arg Ser Asp Gly His Thr Leu Val  
                  50                    55                    60

Val Pro Ala Asp Ala Ala Arg Leu Val Ala Ser Gly Lys Leu Asp Gln  
65                    70                    75                    80

Arg Leu Phe Asp Val Thr Glu Leu Asn Lys Ala Ala Thr Arg Thr Ala  
                  85                    90                    95

His Arg Gly Gly Leu Lys Val Ile Val Gly Tyr Arg Gly Ala Ala Lys  
                  100                    105                    110

Ala Ala Lys Ala Asp Val Arg Asp Ala Gly Thr Val Arg Arg Thr Leu  
                  115                    120                    125

Thr Ser Leu Asn Ala Asp Ala Val Gln Thr Pro Gln Glu Ala Gly Ala  
                  130                    135                    140

Glu Leu Trp Glu Ala Val Thr Asp Gly Asp Arg Thr Ala Ser Gly Val  
 145                      150                      155                      160

Ala Arg Val Trp Leu Asp Gly Val Arg Lys Ala Ser Leu Asp Thr Ser  
                     165                      170                      175

Val Gly Gln Ile Gly Thr Pro Lys Ala Trp Glu Ala Gly Tyr Asp Gly  
                     180                      185                      190

Lys Gly Val Lys Ile Ala Val Leu Asp Thr Gly Val Asp Ala Thr His  
                     195                      200                      205

Pro Asp Leu Lys Gly Gln Val Thr Ala Ser Lys Asn Phe Thr Ser Ala  
                     210                      215                      220

Pro Thr Thr Gly Asp Val Val Gly His Gly Thr His Val Ala Ser Ile  
 225                      230                      235                      240

Ala Ala Gly Thr Gly Ala Gln Ser Lys Gly Thr Tyr Lys Gly Val Ala  
                     245                      250                      255

Pro Gly Ala Lys Ile Leu Asn Gly Lys Val Leu Asp Asp Ala Gly Phe  
                     260                      265                      270

Gly Asp Asp Ser Gly Ile Leu Ala Gly Met Glu Trp Ala Ala Ala Gln  
                     275                      280                      285

Gly Ala Asp Ile Val Asn Met Ser Leu Gly Gly Met Asp Thr Pro Glu

290	295	300	
Thr Asp Pro Leu Glu Ala Ala Val Asp Lys Leu Ser Ala Glu Lys Gly			
305	310	315	320
Ile Leu Phe Ala Ile Ala Ala Gly Asn Glu Gly Pro Gln Ser Ile Gly			
	325	330	335
Ser Pro Gly Ser Ala Asp Ser Ala Leu Thr Val Gly Ala Val Asp Asp			
	340	345	350
Lys Asp Lys Leu Ala Asp Phe Ser Ser Thr Gly Pro Arg Leu Gly Asp			
	355	360	365
Gly Ala Val Lys Pro Asp Leu Thr Ala Pro Gly Val Asp Ile Thr Ala			
	370	375	380
Ala Ser Ala Lys Gly Asn Asp Ile Ala Lys Glu Val Gly Glu Lys Pro			
385	390	395	400
Ala Gly Tyr Met Thr Ile Ser Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val			
	405	410	415
Ala Gly Ala Ala Ala Leu Leu Lys Gln Gln His Pro Glu Trp Lys Tyr			
	420	425	430
Ala Glu Leu Lys Gly Ala Leu Thr Ala Ser Thr Lys Asp Gly Lys Tyr			
	435	440	445

Thr Pro Phe Glu Gln Gly Ser Gly Arg Val Gln Val Asp Lys Ala Ile  
 450 455 460

Thr Gln Thr Val Ile Ala Glu Pro Val Ser Leu Ser Phe Gly Val Gln  
 465 470 475 480

Gln Trp Pro His Ala Asp Asp Lys Pro Val Thr Lys Lys Leu Thr Tyr  
 485 490 495

Arg Asn Leu Gly Thr Glu Asp Val Thr Leu Lys Leu Thr Ser Thr Ala  
 500 505 510

Thr Gly Pro Lys Gly Lys Ala Ala Pro Ala Gly Phe Phe Thr Leu Gly  
 515 520 525

Ala Ser Thr Leu Thr Val Pro Ala Asn Gly Thr Ala Ser Val Asp Val  
 530 535 540

Thr Ala Asp Thr Arg Leu Gly Gly Ala Val Asp Gly Thr Tyr Ser Ala  
 545 550 555 560

Tyr Val Val Ala Thr Gly Ala Gly Gln Ser Val Arg Thr Ala Ala Ala  
 565 570 575

Val Glu Arg Glu Val Glu Ser Tyr Asn Val Thr Leu Lys Val Leu Asp  
 580 585 590

Arg Ser Gly Lys Ala Thr Ala Asn Tyr Met Ala Tyr Leu Ser Gly Leu  
 595 600 605



755	760	765
Ala Lys Glu Phe Ala Thr Val Gln Val Gly Met Gly Ala Ala Ala Ser		
770	775	780
Gly Lys Lys Gly Ala Val Thr Ala Phe Gly Trp Leu Pro Gly Ser Ser		
785	790	795
Gly Ala Ser Gly Phe Ser Gln Glu Gln Lys Leu Pro Ser Thr Arg Thr		
805	810	815
Leu Tyr Leu Ser Thr Val Asn Gly Val Thr Trp Asp Leu Asp Phe Glu		
820	825	830
Gln Leu Gly Gly Val Asp Asn Glu Gly Trp Pro Ile Tyr Asp Ala Val		
835	840	845
Tyr Thr Ile Gly Val Gly Lys Thr Tyr Lys Gly Gly Lys Thr Tyr Lys		
850	855	860
Glu Thr Val Asn Thr Ala Val Phe Gly Pro Arg Leu Thr Ser Ser Tyr		
865	870	875
Gly Val Phe Arg Asp Gly Asn Ser Ile Tyr Gly Val Ile Pro Leu Phe		
885	890	895
Ala Asp Gly Lys Gly His Ala Gly Ser Ser Glu Phe Ser Ser Ala Val		
900	905	910

Thr Thr Leu Tyr Arg Asn Gly Lys Lys Val Gly Ser Asn Asn Asp Pro  
 915 920 925

Leu Phe Gly Glu Glu Gly Phe Thr Val Pro Ser Gly Asp Ala Ala Tyr  
 930 935 940

Arg Leu Thr Thr Ser Val Lys Arg Ser Ala Lys Val Ala Ala Ala Ser  
 945 950 955 960

Thr Arg Ile Asp Ala Ser Trp Thr Phe Arg Ser Lys Lys Thr Ser Gly  
 965 970 975

Glu Lys Gln Leu Pro Val Ser Ser Ala Arg Phe Ala Ala Val Thr Gly  
 980 985 990

Leu Asp Ser Lys Val Ala Ala Gly Lys Lys Ala Thr Phe Pro Val Val  
 995 1000 1005

Val Glu Gly Ala Ala Gln Gly Lys Asn Leu Lys Ser Leu Ala Val Tyr  
 1010 1015 1020

Val Ser Tyr Asn Gly Gly Lys Thr Trp Lys Lys Thr Thr Val Thr Lys  
 1025 1030 1035 1040

Gly Lys Ile Thr Val Lys Asn Pro Ala Lys Gly Lys Ala Ile Ser Phe  
 1045 1050 1055

Arg Ala Lys Ile Thr Asp Lys Lys Gly Asn Ala Ser Leu Ile Thr Ile  
 1060 1065 1070

His Asn Ala Tyr Tyr Gly Lys

1075

<210> 40

<211> 444

5 <212> PRT

<213> Streptovercillium mobaraense

<400> 40

Gln Ala Asp Ile Lys Asp Arg Ile Leu Lys Ile Pro Gly Met Lys Phe

1                    5                    10                    15

Val Glu Glu Lys Pro Tyr Gln Gly Tyr Arg Tyr Leu Val Met Thr Tyr

                  20                    25                    30

Arg Gln Pro Val Asp His Arg Asn Pro Gly Lys Gly Thr Phe Glu Gln

                  35                    40                    45

Arg Phe Thr Leu Leu His Lys Asp Thr Asp Arg Pro Thr Val Phe Phe

                  50                    55                    60

Thr Ser Gly Tyr Asn Val Ser Thr Asn Pro Ser Arg Ser Glu Pro Thr

65                    70                    75                    80

Arg Ile Val Asp Gly Asn Gln Val Ser Met Glu Tyr Arg Phe Phe Thr

                  85                    90                    95

ES 2 372 806 T3

Pro Ser Arg Pro Gln Pro Ala Asp Trp Ser Lys Leu Asp Ile Trp Gln  
100 105 110

Ala Ala Ser Asp Gln His Arg Leu Tyr Gln Ala Leu Lys Pro Val Tyr  
115 120 125

Gly Lys Asn Trp Leu Ala Thr Gly Gly Ser Lys Gly Gly Met Thr Ala  
130 135 140

Thr Tyr Phe Arg Arg Phe Tyr Pro Asn Asp Met Asn Gly Thr Val Ala  
145 150 155 160

Tyr Val Ala Pro Asn Asp Val Asn Asp Lys Glu Asp Ser Ala Tyr Asp  
165 170 175

Lys Phe Phe Gln Asn Val Gly Asp Lys Ala Cys Arg Thr Gln Leu Asn  
180 185 190

Ser Val Gln Arg Glu Ala Leu Val Arg Arg Asp Glu Ile Val Ala Arg  
195 200 205

Tyr Glu Lys Trp Ala Lys Glu Asn Gly Lys Thr Phe Lys Val Val Gly  
210 215 220

Ser Ala Asp Lys Ala Tyr Glu Asn Val Val Leu Asp Leu Val Trp Ser  
225 230 235 240

Phe Trp Gln Tyr His Leu Gln Ser Asp Cys Ala Ser Val Pro Ala Thr  
245 250 255

Lys Ala Ser Thr Asp Glu Leu Tyr Lys Phe Ile Asp Asp Ile Ser Gly  
 260 265 270

Phe Asp Gly Tyr Thr Asp Gln Gly Leu Glu Arg Phe Thr Pro Tyr Tyr  
 275 280 285

Tyr Gln Ala Gly Thr Gln Leu Gly Ala Pro Thr Val Lys Asn Pro His  
 290 295 300

Leu Lys Gly Val Leu Arg Tyr Pro Gly Ile Asn Gln Pro Arg Ser Tyr  
 305 310 315 320

Val Pro Arg Asp Ile Pro Met Thr Phe Arg Pro Gly Ala Met Ala Asp  
 325 330 335

Val Asp Arg Trp Val Arg Glu Asp Ser Arg Asn Met Leu Phe Val Tyr  
 340 345 350

Gly Gln Asn Asp Pro Trp Ser Gly Glu Pro Phe Arg Leu Gly Lys Gly  
 355 360 365

Ala Ala Ala Arg His Asp Tyr Arg Phe Tyr Ala Pro Gly Gly Asn His  
 370 375 380

Gly Ser Asn Ile Ala Gln Leu Val Ala Asp Glu Arg Ala Lys Ala Thr  
 385 390 395 400

Ala Glu Val Leu Lys Trp Ala Gly Val Ala Pro Gln Ala Val Gln Lys

ES 2 372 806 T3

405

410

415

Asp Glu Lys Ala Ala Lys Pro Leu Ala Pro Phe Asp Ala Lys Leu Asp

420

425

430

Arg Val Lys Asn Asp Lys Gln Ser Ala Leu Arg Pro

435

440

<210> 41

<211> 1751

5 <212> DNA

<213> Streptovercillium mobaraense

<220>

<221> CDS

10 <222> (229)..(1659)

<400> 41

gctcctatga gcatcgacgc cgccagcagc gatcggttcg gtctgaccgt cgacgccgac 60

ggcgagcgcg tgtggetgga cgagcccggg cggcccgtgc cgctcgtgcg gccgtgaaag 120

gcccgaaaag agcccaagcc gtgtgaactg cgaggacaaa gggctctggcg caacgcatgt 180

caccccagat aagtgcgcg cgaccttgc gaaccaggg gagggcgc atg cgc aag 237

Met Arg Lys

1

ES 2 372 806 T3

gct ctc aga tcg ctg ctg gcg gcg tcg atg ctc ata gga gcg atc gcc 285  
Ala Leu Arg Ser Leu Leu Ala Ala Ser Met Leu Ile Gly Ala Ile Gly  
5 10 15

gcc ggc agc gcc acg gcg gag gcg gcg tcg atc acc gcc ccg cag gcc 333  
Ala Gly Ser Ala Thr Ala Glu Ala Ala Ser Ile Thr Ala Pro Gln Ala  
20 25 30 35

gac atc aag gac cgc atc ctg aag att ccc ggg atg aag ttc gtc gag 381  
Asp Ile Lys Asp Arg Ile Leu Lys Ile Pro Gly Met Lys Phe Val Glu  
40 45 50

gag aag ccc tac cag ggc tac cgc tac ctc gtg atg acg tac cgg cag 429  
Glu Lys Pro Tyr Gln Gly Tyr Arg Tyr Leu Val Met Thr Tyr Arg Gln  
55 60 65

ccg gtg gac cac cgc aat ccc ggc aag ggg acc ttc gag cag cgc ttc 477  
Pro Val Asp His Arg Asn Pro Gly Lys Gly Thr Phe Glu Gln Arg Phe  
70 75 80

acc ctg ctc cac aag gac acc gac cgg ccg acc gtg ttc ttc acg tcc 525  
Thr Leu Leu His Lys Asp Thr Asp Arg Pro Thr Val Phe Phe Thr Ser  
85 90 95

ggc tac aac gtc tcc acc aac ccc agc cgc agc gag ccc acg cgc atc 573  
Gly Tyr Asn Val Ser Thr Asn Pro Ser Arg Ser Glu Pro Thr Arg Ile  
100 105 110 115

gtg gac ggc aac cag gtg tcg atg gag tac cgg ttc ttc acg ccg tcc 621



ES 2 372 806 T3

230	235	240	
aag tgg gct aag gag aac ggc aag acg ttc aag gtc gtc ggc agc gcc			1005
Lys Trp Ala Lys Glu Asn Gly Lys Thr Phe Lys Val Val Gly Ser Ala			
245	250	255	
gac aag gcg tac gag aac gtc gtc ctc gac ctg gtc tgg tcc ttc tgg			1053
Asp Lys Ala Tyr Glu Asn Val Val Leu Asp Leu Val Trp Ser Phe Trp			
260	265	270	275
cag tac cac ctg cag agc gac tgc gcc tcc gtc ccc gcc acc aag gcg			1101
Gln Tyr His Leu Gln Ser Asp Cys Ala Ser Val Pro Ala Thr Lys Ala			
280	285	290	
tcc acc gac gag ctg tac aag ttc atc gac gac atc tcg ggc ttc gac			1149
Ser Thr Asp Glu Leu Tyr Lys Phe Ile Asp Asp Ile Ser Gly Phe Asp			
295	300	305	
ggc tac acc gac cag ggc ctg gag cgc ttc acc ccg tac tac tac cag			1197
Gly Tyr Thr Asp Gln Gly Leu Glu Arg Phe Thr Pro Tyr Tyr Tyr Gln			
310	315	320	
gcg ggc acc cag ctc ggc gcc cct acg gtg aag aac ccg cac ctc aag			1245
Ala Gly Thr Gln Leu Gly Ala Pro Thr Val Lys Asn Pro His Leu Lys			
325	330	335	
ggc gtg ctg cgg tac ccc ggc atc aac cag ccg cgc tcg tac gtc ccc			1293
Gly Val Leu Arg Tyr Pro Gly Ile Asn Gln Pro Arg Ser Tyr Val Pro			
340	345	350	355

ES 2 372 806 T3

cgc gac atc ccg atg acc ttc cgc ccc ggc gcg atg gcg gac gtc gac	1341
Arg Asp Ile Pro Met Thr Phe Arg Pro Gly Ala Met Ala Asp Val Asp	
360 365 370	
cgc tgg gtg cgc gag gac agc cgg aac atg ctc ttc gtg tac ggg cag	1389
Arg Trp Val Arg Glu Asp Ser Arg Asn Met Leu Phe Val Tyr Gly Gln	
375 380 385	
aac gac ccg tgg agc ggt gaa ccg ttc cgc ctg ggc aag ggc gcc gcc	1437
Asn Asp Pro Trp Ser Gly Glu Pro Phe Arg Leu Gly Lys Gly Ala Ala	
390 395 400	
gcc cgg cac gac tac cgc ttc tac gcc ccg ggc ggc aac cac ggt tcc	1485
Ala Arg His Asp Tyr Arg Phe Tyr Ala Pro Gly Gly Asn His Gly Ser	
405 410 415	
aac atc gcc cag ttg gtg gcc gac gag cgg gcc aag gcc acg gcc gag	1533
Asn Ile Ala Gln Leu Val Ala Asp Glu Arg Ala Lys Ala Thr Ala Glu	
420 425 430 435	
gtc ctg aag tgg gcc ggt gtg gcg ccg cag gcc gtc cag aag gac gag	1581
Val Leu Lys Trp Ala Gly Val Ala Pro Gln Ala Val Gln Lys Asp Glu	
440 445 450	
aag gcc gcc aag ccg ctc geg ccg ttc gac gcc aag ctc gac cgc gtg	1629
Lys Ala Ala Lys Pro Leu Ala Pro Phe Asp Ala Lys Leu Asp Arg Val	
455 460 465	

aag aac gac aag cag agc gcg ctg cgt ccg tagggacca gtgcgtaagg 1679

Lys Asn Asp Lys Gln Ser Ala Leu Arg Pro

470

475

cggggggcgc tccggcgag gggcgcccgc cgtcgcgttc cggaaggccc cgggtgccgc 1739

cgccggtgct tc

1751

<210> 42

<211> 477

5 <212> PRT

<213> Streptovercillium mobaraense

<400> 42

Met Arg Lys Ala Leu Arg Ser Leu Leu Ala Ala Ser Met Leu Ile Gly

1

5

10

15

Ala Ile Gly Ala Gly Ser Ala Thr Ala Glu Ala Ala Ser Ile Thr Ala

20

25

30

Pro Gln Ala Asp Ile Lys Asp Arg Ile Leu Lys Ile Pro Gly Met Lys

35

40

45

Phe Val Glu Glu Lys Pro Tyr Gln Gly Tyr Arg Tyr Leu Val Met Thr

50

55

60

Tyr Arg Gln Pro Val Asp His Arg Asn Pro Gly Lys Gly Thr Phe Glu

65

70

75

80

10

Gln Arg Phe Thr Leu Leu His Lys Asp Thr Asp Arg Pro Thr Val Phe  
 85 90 95

Phe Thr Ser Gly Tyr Asn Val Ser Thr Asn Pro Ser Arg Ser Glu Pro  
 100 105 110

Thr Arg Ile Val Asp Gly Asn Gln Val Ser Met Glu Tyr Arg Phe Phe  
 115 120 125

Thr Pro Ser Arg Pro Gln Pro Ala Asp Trp Ser Lys Leu Asp Ile Trp  
 130 135 140

Gln Ala Ala Ser Asp Gln His Arg Leu Tyr Gln Ala Leu Lys Pro Val  
 145 150 155 160

Tyr Gly Lys Asn Trp Leu Ala Thr Gly Gly Ser Lys Gly Gly Met Thr  
 165 170 175

Ala Thr Tyr Phe Arg Arg Phe Tyr Pro Asn Asp Met Asn Gly Thr Val  
 180 185 190

Ala Tyr Val Ala Pro Asn Asp Val Asn Asp Lys Glu Asp Ser Ala Tyr  
 195 200 205

Asp Lys Phe Phe Gln Asn Val Gly Asp Lys Ala Cys Arg Thr Gln Leu  
 210 215 220

Asn Ser Val Gln Arg Glu Ala Leu Val Arg Arg Asp Glu Ile Val Ala

225	230	235	240
Arg Tyr Glu Lys Trp Ala Lys Glu Asn Gly Lys Thr Phe Lys Val Val			
	245	250	255
Gly Ser Ala Asp Lys Ala Tyr Glu Asn Val Val Leu Asp Leu Val Trp			
	260	265	270
Ser Phe Trp Gln Tyr His Leu Gln Ser Asp Cys Ala Ser Val Pro Ala			
	275	280	285
Thr Lys Ala Ser Thr Asp Glu Leu Tyr Lys Phe Ile Asp Asp Ile Ser			
	290	295	300
Gly Phe Asp Gly Tyr Thr Asp Gln Gly Leu Glu Arg Phe Thr Pro Tyr			
305	310	315	320
Tyr Tyr Gln Ala Gly Thr Gln Leu Gly Ala Pro Thr Val Lys Asn Pro			
	325	330	335
His Leu Lys Gly Val Leu Arg Tyr Pro Gly Ile Asn Gln Pro Arg Ser			
	340	345	350
Tyr Val Pro Arg Asp Ile Pro Met Thr Phe Arg Pro Gly Ala Met Ala			
	355	360	365
Asp Val Asp Arg Trp Val Arg Glu Asp Ser Arg Asn Met Leu Phe Val			
	370	375	380

Tyr Gly Gln Asn Asp Pro Trp Ser Gly Glu Pro Phe Arg Leu Gly Lys  
385 390 395 400

Gly Ala Ala Ala Arg His Asp Tyr Arg Phe Tyr Ala Pro Gly Gly Asn  
405 410 415

His Gly Ser Asn Ile Ala Gln Leu Val Ala Asp Glu Arg Ala Lys Ala  
420 425 430

Thr Ala Glu Val Leu Lys Trp Ala Gly Val Ala Pro Gln Ala Val Gln  
435 440 445

Lys Asp Glu Lys Ala Ala Lys Pro Leu Ala Pro Phe Asp Ala Lys Leu  
450 455 460

Asp Arg Val Lys Asn Asp Lys Gln Ser Ala Leu Arg Pro  
465 470 475

<210> 43

<211> 330

5 <212> PRAT

<213> Streptovercillium cinnamoneum

<400> 43

Ser Asp Asp Arg Glu Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro  
1 5 10 15

ES 2 372 806 T3

Glu Ala Tyr Arg Ala Tyr Gly Gly Arg Ala Thr Thr Val Val Asn Asn  
20 25 30

Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Lys Lys  
35 40 45

Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu Lys Leu Ser Tyr Gly Cys Val  
50 55 60

Gly Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Pro Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala  
65 70 75 80

Phe Ala Ser Phe Asp Glu Asn Lys Tyr Lys Asn Asp Leu Lys Asn Thr  
85 90 95

Ser Pro Arg Pro Asp Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Ile Ala  
100 105 110

Lys Gly Ser Phe Asp Glu Gly Lys Gly Phe Lys Arg Ala Arg Asp Val  
115 120 125

Ala Ser Val Met Asn Lys Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Gly Thr  
130 135 140

Tyr Ile Asn Asn Leu Lys Thr Glu Leu Thr Asn Asn Asn Asp Ala Leu  
145 150 155 160

Leu Arg Glu Asp Ser Arg Ser Asn Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr  
165 170 175

Pro Ser Phe Lys Glu Arg Asp Gly Gly Asn Tyr Asp Pro Ser Lys Met

180 185 190

Lys Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Gln Arg

195 200 205

Gly Ser Ser Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Glu Ala Phe Arg Pro

210 215 220

Asp Gln Gly Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Lys Asp Arg Ser Ile Pro

225 230 235 240

Arg Ser Pro Ala Lys Pro Gly Glu Gly Trp Val Asn Phe Asp Tyr Gly

245 250 255

Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Thr Trp Thr

260 265 270

His Gly Asp His Tyr His Ala Pro Asn Ser Asp Leu Gly Pro Met His

275 280 285

Val His Glu Ser Lys Phe Arg Lys Trp Ser Ala Gly Tyr Ala Asp Phe

290 295 300

Asp Arg Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr

305 310 315 320

Ala Pro Ala Lys Val Glu Gln Gly Trp Pro

325 330

<210> 44

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 44

10 ggcgatgggg aagagaaggg g 21

<210> 45

<211> 32

<212> DNA

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

20 <400> 45

ggcggatcct cgcgtcgaga ggcgtggact ga 32

<210> 46

<211> 21

25 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

30

<400> 46

tacgaattcg agctcgttac c 21

<210> 47

35 <211> 43

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

5

<400> 47

ccccttctct tcccacatgc ctgccgttgc cacaggtgcg gcc 43

<210> 48

10 <211> 46

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 48

ggggtgaccc tgtcgtcga gtcgggggcc cgggagggcg cgctgg 46

20 <210> 49

<211> 26

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 49

aacggggaga acagcacggc cgccgg 26

30

<210> 50

<211> 29

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 50

ggcgaattct ccggcgggcc gtcaccggt 29

5

<210> 51

<211> 30

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 51

15 ggcaagctta aattcctgtg aattagctga 30

<210> 52

<211> 44

<212> DNA

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

25 <400> 52

cggccgtgct gttctccccg ttgcccgtg ccacaggtgc ggcc 44

<210> 53

<211> 20

30 <212> PRT

<213> Streptovercillium mobaraense

<400> 53

Gln Ala Asp Ile Lys Asp Arg Ile Leu Lys Ile Pro Gly Met Lys Phe

1

5

10

15

Val Glu Glu Lys

20

<210> 54

<211> 33

<212> DNA

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador para syPEP

10 <400> 54

aagatcccccg ggatgaagtt cgtcgaggag aag

33

<210> 55

<211> 23

15 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

20

<400> 55

gaggcggcgt cgatcaccgc ccc

23

<210> 56

25 <211> 32

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 56  
 gccaaagcttg aagcaccggc ggcggcaccc gg 32

<210> 57  
 5 <211> 46  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 57  
 gggggcgtga tcgacggcg cctgcccgtt gccacaggtg cggcca 46

15 <210> 58  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 58  
 gtgaccctgt cgtcggagtc ccggaacgac gggccggcgc 40

25 <210> 59  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 59  
 35 gtgaccctgt cgtcggagtc cgacgggccc gcgctcgaag 40

<210> 60

<211> 40

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 60

10 aatggcgcgg gggaagagac gaagtcctac gccgaaacct 40

<210> 61

<211> 40

<212> DNA

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

20 <400> 61

gagacgaagt cctacgccga aacctaccgc ctcacggcgg 40

<210> 62

<211> 40

25 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

30

<400> 62

gtctctccc ccgcgccatt tgccgtgcc acaggtgcgg 40

<210> 63

35 <211> 40

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

5

<400> 63

tcggcgtagg actctgtctc tgccgtgcc acaggtgcgg 40

<210> 64

10 <211> 40

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 64

gtgaccctgt cgtcggagtc cttggggccg aacgacgggc 40

20 <210> 65

<211> 40

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 65

gtgaccctgt cgtcggagtc gcggggccg aacgacgggc 40

30

<210> 66

<211> 40

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 66

gtgaccctgt cgtcggagtc cttcgggccg gcgctcgaag 40

5

<210> 67

<211> 40

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 67

15 gtgaccctgt cgtcggagtc gcgccccg gcgctcgaag 40

<210> 68

<211> 4

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (4)

25 <223> Xaa es Pro-pNA, e p-nitroanilida

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: sustrato para syPEP

30 <400> 68

**Phe Arg Ala Xaa**

**1**

<210> 69

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial:secuencia adicional a transglutaminasa nativa

5

<400> 69

**Ser Ala Gly Pro Lys**

1

5

<210> 70

10

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15

<223> Descripción de Secuencia Artificial:secuencia adicional a transglutaminasa nativa

<400> 70

**Ser Ala Gly Pro Arg**

1

5

20

## REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para producir transglutaminasa que comprende cultivar una bacteria corineforme que tiene un constructo de expresión genético en el cual una secuencia de ácido nucleico codificante de un dominio de péptido señal derivado de una bacteria corineforme se conecta al lado de aguas abajo de una secuencia promotora que funciona en una bacteria corineforme y en el cual una secuencia de ácido nucleico codificante de transglutaminasa que contiene una parte pro-estructural se conecta al lado de aguas abajo de dicha secuencia de ácido nucleico codificante de dicho dominio de péptido señal, permitiendo que dicha bacteria corineforme produzca y secrete dicha transglutaminasa que contiene una parte pro-estructural, y realizar luego la escisión y eliminación de la parte pro-estructural de dicha transglutaminasa que contiene una parte pro-estructural.
- 2.- El método según la reivindicación 1, en el cual el péptido señal es un péptido señal de una proteína de la superficie derivada de una bacteria corineforme.
- 3.- El método según la reivindicación 1, en el cual el péptido señal es un péptido señal de una proteína de la superficie derivada de *Corynebacterium glutamicum*.
- 4.- El método según la reivindicación 3, en el cual el péptido señal tiene la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 29.
- 5.- El método según la reivindicación 1, en el cual el péptido señal es un péptido señal de una proteína de la superficie derivada de *Corynebacterium ammoniagenes*.
- 6.- El método según la reivindicación 5, en el cual el péptido señal tiene la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 2.
- 7.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el cual la parte pro-estructural corresponde a una parte pro-estructural de una transglutaminasa derivada de un actinomiceto.
- 8.- El método según la reivindicación 7, en el cual la parte pro-estructural tiene la secuencia según SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.
- 9.- El método según la reivindicación 7, en el cual una secuencia de aminoácidos de la parte pro-estructural, es cualquiera de las secuencias de aminoácidos según SEQ ID NO: 30 a SEQ ID NO: 38.
- 10.- El método según la reivindicación 1, en el cual la escisión y eliminación de la parte pro-estructural se efectúa con una proteasa.
- 11.- El método según la reivindicación 10, en el cual la bacteria corineforme que produce y secreta la transglutaminasa produce también la proteasa.
- 12.- El método según la reivindicación 11, en el cual la escisión y eliminación de la parte pro-estructural se realiza con la proteasa y una peptidasa.
- 13.- El método según la reivindicación 12, en el cual la bacteria corineforme que produce y secreta la transglutaminasa produce adicionalmente la proteasa y la peptidasa.
- 14.- El método según la reivindicación 10 ó 12, en el cual la proteasa se deriva de un actinomiceto.
- 15.- El método según la reivindicación 10 ó 12, en el cual la proteasa se deriva de *Streptomyces albogriseolus*.
- 16.- El método según la reivindicación 12, en el cual la peptidasa se deriva de un actinomiceto.
- 17.- El método según la reivindicación 12, en el cual la peptidasa se deriva de *Streptomyces mobaraense*.
- 18.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el cual la transglutaminasa es una transglutaminasa derivada de un actinomiceto.
- 19.- El método según la reivindicación 18, en el cual la transglutaminasa es la transglutaminasa derivada de *Streptovercillium mobaraense*.
- 20.- El método según la reivindicación 19, en el cual la transglutaminasa tiene la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 5.
- 21.- El método según la reivindicación 18, en el cual la transglutaminasa es una transglutaminasa derivada de *Streptovercillium cinnamoneum*.

22.- El método según la reivindicación 21, en el cual la transglutaminasa tiene la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 43.