

# $\alpha$ -amylazy: struktura i mechanizm działania

Edward Galas  
Halina Kalinowska  
Marianna Turkiewicz  
Instytut Biochemii Technicznej  
Politechnika Łódzka

**A**lfa-amylazy [4-glukanohydrolazy  $\alpha$ -1,4-glukanu, EC 3.2.1.1], czyli endo-hydrolazy rozkładające wiązania  $\alpha$ -1,4-glikozydowe w skrobi i pokrewnych  $\alpha$ -glukanach, stanowią grupę enzymów szeroko rozpowszechnionych w przyrodzie. Wytwarzają je organizmy zwierzęce, roślinne oraz drobnoustroje. Struktura  $\alpha$ -amylaz, pochodzących z różnych źródeł jest zróżnicowana, podobnie jak ich masy cząsteczkowe, warunki optymalne dla aktywności, stabilność oraz skład i wzajemne proporcje maltooligosacharydów, będących produktami hydrolizy skrobi przez te enzymy (1-3).

Mimo różnic, wszystkie  $\alpha$ -amylazy wykazują wiele podobnych cech molekularnych, do których należą: wielodomenowa struktura, zbliżona konformacja domeny katalitycznej oraz mechanizm działania tych enzymów.

## 1. Molekularna struktura $\alpha$ -amylaz

Badania strukturalne  $\alpha$ -amylaz i innych enzymów amylolytycznych są zaawansowane. Kilka z nich, tj.  $\alpha$ -amylazę trzustki wieprzowej (4), Taka-amylazę *Aspergillus oryzae* (5) i  $\alpha$ -amylazę *Aspergillus niger* (6) poddano szczegółowej analizie rentgenograficznej, dzięki której stało się możliwe określenie ich konformacji. Dla ponad piętnastu bakteryjnych enzymów amylolytycznych ustalono pełną strukturę pierwszorzędową (7-15). Częściową strukturę przestrzenną określono dla izoamylazy [EC 3.2.1.68], pululanazy [EC 3.2.1.41], oligo-1,6-glukozydazy [EC 3.2.1.10], glukanotransferazy cyklodekstryn [EC 2.4.1.19],  $\alpha$ -glukozydazy [EC 3.2.1.20], kompleksu  $\alpha$ -amylaza-pululanaza, neopululanazy, a także enzymów syntetyzujących wiązania  $\alpha$ -1,6-glikozydowe w glikogenie oraz amylopektynach ziemniaka i ryżu [EC 2.4.1.18]. Wszystkie wymienione enzymy, podobnie jak  $\alpha$ -amylazy, atakując wiązania  $\alpha$ -1,4- bądź  $\alpha$ -1,6-glikozydowe w substratach skrobiowych, zachowują w produkcji hydrolizy  $\alpha$ -konfigurację hydroksylu związane-



go z anomerycznym węglem ( $C_1$ ). Wykazano, że cząsteczki enzymów amylolytycznych o takiej specyficzności posiadają pewne zbliżone cechy strukturalne (15,16), wyraźnie je odróżniające od drugiej grupy enzymów amylolytycznych, np. glukoamylaz i  $\beta$ -amylaz, które hydrolizując wiązanie  $\alpha$ -glikozydowe, zmieniają położenie hydroksylu przy  $C_1$  z  $\alpha$ - na  $\beta$ - (17,18).

Wszystkie dotąd scharakteryzowane enzymy amylolytyczne należą do białek zawierających w cząsteczce liczne domeny strukturalne, których liczba jest zmienna i zależna od rodzaju i pochodzenia enzymu. Do tej pory opisano około dziesięciu strukturalnych domen tych enzymów, które przyjęto oznaczać symbolami literowymi od A do J. Funkcja większości tych domen jest słabo zbadana lub nieznaną.

Następną charakterystyczną prawidłowością budowy molekularnej enzymów amylolytycznych jest występowanie w ich cząsteczkach struktury naddrugorzędowej (ang. *supersecondary structure*), zorganizowanej w postać zwaną  $(\alpha/\beta)_8$  walcem [ $(\alpha/\beta)_8$ -barrel]. Identycznego typu naddrugorzędowe struktury wykryto również w innych, niehydrolitycznych enzymach, np. w izomerazie triozofosforanowej [EC 5.3.1.1], aldolazie fruktozo-1,6-bisfosforanowej [EC 4.1.2.13] i kinazie pirogronianowej [EC 2.7.1.40] (19), co według niektórych autorów sugeruje możliwość biosyntezy wielu białek z gotowych, wspólnych modułów (19).

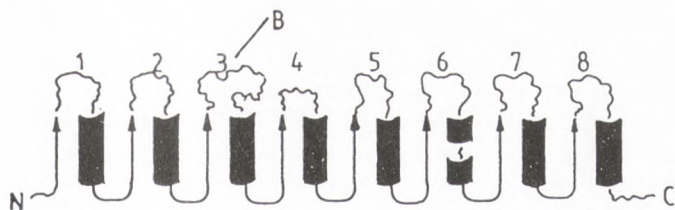
$\alpha$ -amylazy pleśniowe, a także enzym trzustkowy, których struktury rozwiązano pod koniec lat osiemdziesiątych, mają trójdomenowe cząsteczki; zawierają domeny A, B i C (4,15,16,20). Największą spośród nich jest domena A, obejmująca np. w  $\alpha$ -amylazie z trzustki wieprzowej około 330 reszt aminokwasowych, tj. — począwszy od N-końca molekuly — reszty od 1 do 100 oraz od 169 do 407, zorganizowane w strukturę  $(\alpha/\beta)_8$  walca (rys. 1a i b) (5,15,16). W Taka-amylazie *A. oryzae* domena ta obejmuje reszty 1-118 i 182-379 (5), również tworzące  $(\alpha/\beta)_8$  walec.

Struktura naddrugorzędowa, będąca odmianą  $(\alpha/\beta)_8$  walca, występuje również w  $\beta$ -amylazach, tworząc tzw. domenę  $A^1$  (17), natomiast w glukoamylazach występuje inna odmiana walcowatej struktury, zbudowanej z dwunastu odcinków  $\alpha$ -helisy, z których sześć tworzy warstwę wewnętrzną walca, sześć natomiast jego warstwę zewnętrzną (rys. 2). Została ona nazwana domeną J (18).

Domena B jest w  $\alpha$ -amylazach niewielka. Obejmuje kilkadziesiąt reszt aminokwasowych łańcucha polipeptydowego (w  $\alpha$ -amylazie trzustki wieprzowej reszty 101-168, w Taka-amylazie: 119-181) (5), zlokalizowanych pomiędzy trzecim odcinkiem łańcucha o strukturze  $\beta$ -faldowej ( $N\beta 3$ ) i trzecim — o strukturze  $\alpha$ -helisy ( $N\alpha 3$ ), wchodzącymi w skład  $(\alpha/\beta)_8$  walca domeny A (rys. 1a).

Mercier i Colonna (20) określają domeny A i B omawianych  $\alpha$ -amylaz wspólnym terminem domeny „N-terminalnej”.

Domena A sąsiaduje nie tylko z domeną B, lecz również z domeną C, obejmującą około 100 reszt aminokwasowych (w  $\alpha$ -amylazie trzustki wieprzowej — reszty 408-496, w Taka-amylazie: 380-478), przyległych do C-końca łańcucha polipeptydowego enzymu (5). Domeny B i C są natomiast w  $\alpha$ -amylazach przestrzennie rozdzielone.

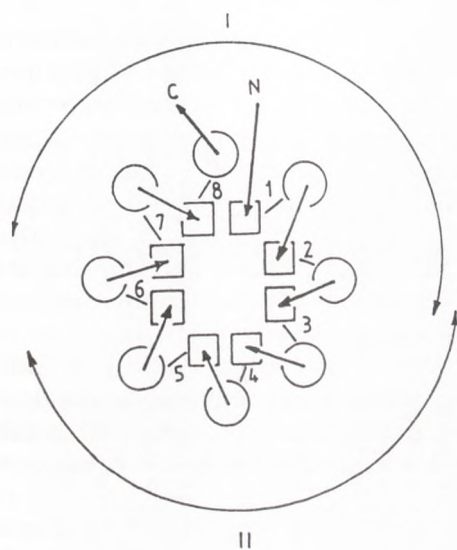


a) elementy strukturalne  $(\alpha/\beta)_8$  walca.

N — N-koniec cząsteczki enzymu; C — C-koniec cząsteczki enzymu;  $\uparrow$  — fragment o strukturze  $\beta$ -fałdowej;  $\blacksquare$  — fragment o strukturze  $\alpha$ -helisy.

Cyframi 1-8 oznaczono „pętle”, tj. fragmenty łańcucha polipeptydowego o nieperiodycznej strukturze drugorzędowej.

B — domena B  $\alpha$ -amylaz (pętla 3, zlokalizowana między segmentami N $\beta$ 3 i N $\alpha$ 3  $(\alpha/\beta)_8$  walca);



b) poprzeczny przekrój struktury  $(\alpha/\beta)_8$  walca w  $\alpha$ -amylazach.

N — N-koniec cząsteczki enzymu;

C — C-koniec cząsteczki enzymu;

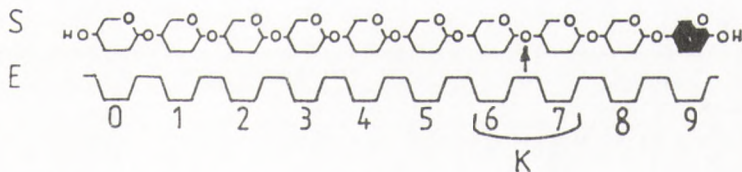
$\circ$  — fragment o strukturze  $\alpha$ -helisy;

$\square$  — fragment o strukturze  $\beta$ -fałdowej.

Cyframi 1-8 oznaczono pętle (por. z rys. 1a). Strzałki wskazują kierunek łańcucha polipeptydowego (od N- do C-końca).

I — pętle zaangażowane w tworzenie podmiejsca 0-6 (por. z rys. 1c);

II — pętle zaangażowane w tworzenie podmiejsca 7-9 (por. z rys. 1c);



c) usytuowanie cząsteczki substratu (maltodekaoza, S) względem obszaru centrum aktywnego  $\alpha$ -amylazy (E). Cyframi od 0 do 9 oznaczono kolejne podmiejsca wiążące reszty glukopiranozy ( $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ ) substratu.

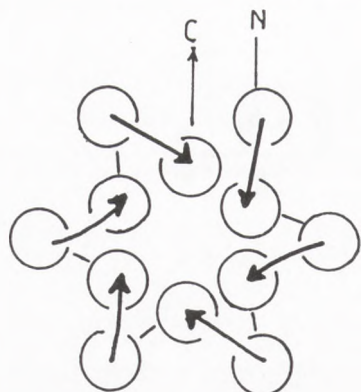
K — oznacza obszar miejsca katalitycznego.

Atakowane wiązanie glikozydowe zaznaczono strzałką.

$\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_5$  — oznacza redukującą resztę glukozy.

Rys. 1. Schemat struktury katalitycznej domeny A  $\alpha$ -amylaz i pokrewnych enzymów (16,19).



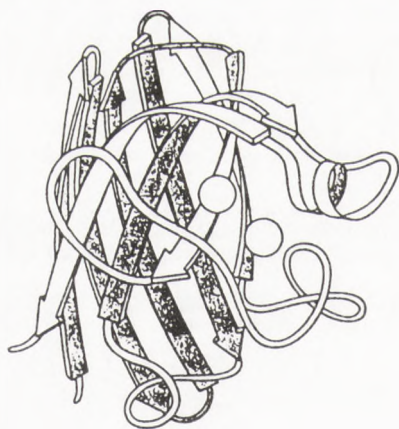


Rys. 2. Przekrój poprzeczny strukturalnej domeny J (katalityczna domena glikoamylaz (18)). 12 odcinków  $\alpha$ -helisy tworzy  $\alpha/\alpha$ -walec, składający się z dwóch współosiowych warstw (po 6 równoległych względem siebie fragmentów w jednej warstwie).

Domena C, zwana czasem „C-terminalną”, charakteryzuje się strukturą  $\beta$ -warstwową ( $\beta$ -sandwich), zwaną inaczej strukturą greckiego klucza (ang. *Greek key*), ze względu na podobieństwo do motywu geometrycznego często spotykanego w antycznej ceramice (15,19). Składa się ona z ośmiu  $\beta$ -fałdowych odcinków, leżących w dwóch płaszczyznach, po cztery w każdej (rys. 3). Sąsiadujące w domenie C fragmenty łańcucha polipeptydowego są ułożone przeciwrównolegle. Domena ta występuje w większości enzymów amylolitycznych, rozszczepiających wiązania  $\alpha$ -1,4-glikozydowe, natomiast nie ustalono dotąd, czy zawierają ją enzymy hydrolizujące, bądź syntetyzujące wiązania  $\alpha$ -1,6-glikozydowe w skrobi i pokrewnych polisacharydach (15,16).

W obrębie domeny A jest zlokalizowane aktywne centrum  $\alpha$ -amylaz i wielu innych enzymów amylolitycznych (15,16). Kilka reszt aminokwasowych domeny B uczestniczy w wiązaniu strukturalnego jonu wapniowego (6), a także substratu (5); wchodzi one zatem w skład miejsca wiążącego aktywnego centrum  $\alpha$ -amylaz.

Funkcja domeny C nie jest wyjaśniona, choć mutacje w obrębie tej domeny



Rys. 3. Schemat struktury domeny C ( $\beta$ -warstwową, *Greek key*) w cząsteczkach  $\alpha$ -amylaz i pokrewnych enzymów amylolitycznych (15,19) (objaśnienia podano w tekście).

w  $\alpha$ -amylazie *Bacillus stearothermophilus* prowadziły do inaktywacji enzymu, co sugeruje istotny udział domeny C w utrzymaniu aktywności enzymów amylolitycznych ją zawierających (21).

W cząsteczce glukanotransferazy cyklodekstryn *Bacillus* sp., oprócz domen A, B i C, podobnych jak w  $\alpha$ -amylazach, wykryto za pomocą rentgenowskiej analizy strukturalnej dodatkową domenę D (reszty aminokwasowe 492-570) o nieznannej funkcji (15,16). Prawdopodobnie również w maltogennej  $\alpha$ -amylazie *B. stearothermophilus* występuje taka domena (reszty 491-564), bowiem odpowiednie fragmenty łańcuchów polipeptydowych obu enzymów wykazują znaczną homologię sekwencji aminokwasów. W enzymach tych jest obecna jeszcze inna domena, oznaczona symbolem E (reszty odpowiednio, 571-664 i 565-684), znaleziona również w  $\beta$ -amylazie *Clostridium thermosulfurogenes*, w glukoamylazach *A. niger* i *A. oryzae*, a także w maltotetrahydrolazie *Pseudomonas saccharophila* (15). Domena E bierze udział w adsorpcji glukoamylaz na powierzchni granul surowej skrobi, umożliwiając tym samym atak enzymu na nierozpuszczalny substrat (15).

W niektórych enzymach amylolitycznych, np. w izoamylazie *Pseudomonas amyloclavata* i w pululanazach *B. stearothermophilus* i *Klebsiella pneumoniae*, domenę A poprzedza dodatkowa krótka domena F o nieznannej funkcji (15,22-25). Molekularną odmianą tej domeny jest prawdopodobnie domena G, stwierdzona w cząsteczkach neopululanazy i kompleksu  $\alpha$ -amylaza-pululanaza *C. thermosulfuricum* (26,27). W tym ostatnim enzymie przy N-końcu cząsteczki występują także dwa odcinki łańcucha polipeptydowego, określane jako domeny H (15).

Domenę I znaleziono wyłącznie w enzymach amylolitycznych o wysokich masach cząsteczkowych. Stwierdzono ją np. w  $\alpha$ -amylazie alkalofilnej gram-dodatniej bakterii (15), w kompleksie  $\alpha$ -amylaza-pululanaza i w kompleksie  $\beta$ -amylaza- $\alpha$ -amylaza, wytwarzanym przez *B. polymyxa* (15,28). Aktywności tego drugiego kompleksu ulegają rozdzieleniu w procesie potranslacyjnej ograniczonej proteolizy, zachodzącej właśnie w obrębie domeny I (28).

Niektóre  $\alpha$ -glukozydazy ssaków, drożdży i pleśni, a także bakteryjna 4- $\alpha$ -glukanotransferaza [EC 2.4.1.25] nie zawierają w cząsteczkach żadnej z opisanych domen strukturalnych enzymów amylolitycznych. Wykazano jednakże, że występuje w nich krótka sekwencja, analogiczna do sekwencji pętli zlokalizowanej po drugim odcinku  $\beta$ -wałdowym (N $\beta$ 2) w strukturze ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> walca domeny A  $\alpha$ -amylaz opisanych w tym rozdziale (rys.1a) (29). Pętla ta bierze udział w wiązaniu substratu.

Występowanie zbliżonych strukturalnie domen u enzymów amylolitycznych, wykazujących wyraźne różnice w specyficzności katalitycznej, można uznać za dowód istnienia wspólnej drogi ewolucyjnej tej grupy białek enzymatycznych.



## 2. Struktura domeny katalitycznej $\alpha$ -amylaz

Katalityczna domena A posiada charakterystyczną budowę przestrzenną, określaną jako  $(\alpha/\beta)_8$  walec (16,19). Składa się on z dwóch warstw o wspólnej osi (rys.1a i b). Warstwę wewnętrzną stanowi osiem ułożonych równolegle względem siebie fragmentów łańcucha polipeptydowego o strukturze  $\beta$ -fałdowej, przedzielonych ośmioma segmentami  $\alpha$ -helisy, tworzącymi zewnętrzną powłokę walca. Szósty segment  $\alpha$ -helisy dzieli się na dwie krótsze części (rys.1a). C-końcowy aminokwas każdego obszaru  $\beta$ -fałdowego i N-końcową resztę odcinka  $\alpha$ -helisy łączy pętla, będąca fragmentem łańcucha polipeptydowego o nieperiodycznej strukturze drugorzędowej. Przypuszcza się, że centrum aktywne enzymów amylolitycznych, a zwłaszcza  $\alpha$ -amylaz, zbudowane jest z niektórych aminokwasów należących do tych nieregularnych pętli (16).

Centra aktywne enzymów hydrolizujących skrobię składają się z miejsca katalitycznego i kilku podmiejsc wiążących, czyli obszarów centrum aktywnego zdolnych do oddziaływania z określonymi resztami glukopiranozowymi substratu (16,20,30). Odmienna specyficzność substratowa, wykazywana przez te biokatalizatory, wynika z różnej liczby podmiejsc w centrum aktywnym oraz natury reszt aminokwasowych, wchodzących w skład każdego z nich, determinujących powinowactwo do substratu. Model centrum aktywnego hydrolaz glikozydowych z grupy  $\alpha$ -amylaz przedstawiono na rys. 1c. Każde z podmiejsc oznaczone cyfrą od 0 do 9 oddziałuje z jedną resztą glukopiranozową substratu, jakim jest w tym przypadku (rys. 1c) maltodekaoza, która zostaje rozłożona do maltoheptaazy i maltotriozy.

Porównanie specyficzności i struktury przestrzennej różnych  $\alpha$ -amylaz i innych pokrewnych enzymów, pozwoliło na sformułowanie pewnych ogólnych wniosków, charakteryzujących ich aktywne centra (15,16,20,31):

1. Podmiejsca 0-6 wiążące substrat od końca nieredukującego są w  $\alpha$ -amylazach zbudowane z aminokwasów należących do pętli 1,2,3,7 i 8 domeny A.

2. Podmiejsca 7-9 wiążące substrat od jego końca redukującego, tworzą reszty aminokwasowe umiejscowione na pętlach 3-6 tej domeny.

3. Pętla 3, czyli domena B  $\alpha$ -amylaz, jest dłuższa od pozostałych i składa się z ponad 40 reszt aminokwasowych, dzięki czemu dostarcza aminokwasów wiążących do dwóch podmiejsc centrum aktywnego.

4. Różnice w liczbie podmiejsc w centrum aktywnym  $\alpha$ -amylaz są wynikiem zmiennej długości i odmiennego sfałdowania pętli łączących odcinki o strukturze  $\beta$ -fałdowej i  $\alpha$ -helisy. Zablokowanie jednego z końców centrum aktywnego przez pofałdowaną pętlę powoduje, że enzym wykazuje aktywność egzozamylazy. Jeśli wynikiem budowy pętli są tylko dwa podmiejsca wiążące w centrum aktywnym, tj. szóste i siódme, enzym wykazuje aktywność wobec maltozy, czyli jest  $\alpha$ -glukozydazą.

5. Wszystkie  $\alpha$ -amylazy zawierają podmiejsca od 4 do 8, natomiast różnią się posiadaniem podmiejsc 1-3 i 9-11. W  $\alpha$ -amylazie trzustki wieprzowej występują tylko podmiejsca 4-8.  $\alpha$ -amylazy ssaków i *Bacillus subtilis* są pozbawione podmiejsca 1.  $\alpha$ -amylaza *Bacillus amyloliquefaciens* posiada to pod-



miejsce. W  $\alpha$ -amylazach jęczmienia występuje co najmniej 10 podmiejsc wiążących, w tym podmiejsce 1.

6. Odmienny skład mieszaniny produktów uwalnianych w wyniku ataku różnych hydrolaz glikozydowych na te same substraty skrobiowe jest rezultatem nie tylko różnic w liczbie podmiejsc centrum aktywnego, ale także obecności innych reszt aminokwasowych w podmiejskach. Na przykład  $\alpha$ -amylazy zawierają reszty Arg oraz Lys w pętli 4 i często sąsiadującą z tą ostatnią resztę His, zaś w pętli 5 posiadają hydrofobową resztę alifatyczną, która w cząsteczkach glukanotransferaz cyklodekstryn jest zastąpiona resztą Phe. W przypadku izozymów  $\alpha$ -amylazy ludzkiej, subtelne różnice w specyficzności substratowej i składzie produktów amylolizy są wynikiem niewielkich zmian sekwencji aminokwasowej w podmiejscu 4.

7. Enzymy zdolne do hydrolizy i syntezy obu typów wiązań, tj.  $\alpha$ -1,4- i  $\alpha$ -1,6-glikozydowych, takie jak neopululanaza, kompleks  $\alpha$ -amylaza-pululanaza i enzymy rozgałęziające, nie posiadają charakterystycznych dla  $\alpha$ -amylaz i glukanotransferaz cyklodekstryn reszt Lys i His w pętli 4. Dotąd nie wykryto żadnej cechy strukturalnej, wyróżniającej tę grupę białek.

Zmianę specyficzności działania niektórych enzymów amylolitycznych można osiągnąć dokonując pewnych szerszych zmian w obrębie ich cząsteczek na drodze proteolizy. Degradując, np. przy udziale proteinaz, cząsteczki  $\alpha$  amylaz i glukoamylaz rozkładających surową skrobię wykazano, że domena C-końcowa tych hydrolaz glikozydowych pełni ważną funkcję w wiązaniu nierozpuszczalnego substratu. Prawdopodobnie enzymy te zawierają w obrębie obszaru C-końcowego domenę E (32-35) już omówioną.

### 3. Sposób wiązania jonów wapniowych w cząsteczkach $\alpha$ -amylaz

$\alpha$ -amylazy zawierają silnie związany jon wapniowy (najczęściej w proporcji molarnej [enzym :  $\text{Ca}^{2+}$ ] jak 1:1), niezbędny zarówno dla stabilizacji struktury wtórnej enzymu, jak i jego aktywności katalitycznej. Podobnie jak w przypadku innych białek enzymatycznych, nadmiar jonów wapniowych w środowisku reakcji powoduje spadek aktywności  $\alpha$ -amylaz (36).

Aby wyjaśnić ten dwójaki wpływ jonów wapniowych na cząsteczki tych enzymów, podjęto badania krystalograficzne kwaśnej  $\alpha$ -amylazy *A. niger* oraz Taka-amylazy *A. oryzae* (6). W obecności 20 mM  $\text{Ca}^{2+}$  pierwszy enzym zachowuje tylko 1% wyjściowej aktywności, zaś drugi około 50%.

Badania te wykazały, że w cząsteczkach obu enzymów jon wapniowy wiąże się z ośmioma ligandami, przy czym porównanie obu miejsc wiążących wapni w omawianych  $\alpha$ -amylazach wskazuje na ich daleko posuniętą analogię. Geometria przestrzenna układu przypomina przekręconą podwójną piramidę pentagonalną (ang. *a distorted pentagonal bipyramid*), w której 3 cząsteczki wody, karbonylowe atomy tlenu z reszt Glu162 i Asn121 tworzą 5-członowy pierścień, zaś punktami szczytowymi są karbonylowy tlen Glu210 w *A. niger*



(His210 u *A. oryzae*) i grupa karboksylowa (obydwa karboksylowe atomy tlenu) Asp175. Silna sieć wiązań wodorowych wiąże dodatkowo wszystkie uczestniczące w koordynacji cząsteczki wody, połączone bezpośrednio z atomami białka.

Miejsce wiążące jon wapniowy w obu  $\alpha$ -amylazach *Aspergillus* tworzą zatem reszty należące do dwóch domen: A (fragment o strukturze  $\beta$ -wałdowej) oraz B. Jon wapniowy łączy je i utrzymuje strukturalną integralność aktywnego centrum omawianych enzymów.

W przedstawionym modelu, miejsce wiążące jon  $\text{Ca}^{2+}$  można określić jako motyw typu: [odcinek  $\beta$  — pętla]. Jest to struktura odmienna od struktury miejsca wiążącego wapń w innych białkach, np. w kalmodulinie i proowoalbuminie (19). Jon wapniowy wiąże się w nich z miejscem o motywie strukturalnym typu:  $\alpha$ -helisa (tzw. E) — pętla —  $\alpha$ -helisa (tzw. F), a ściślej ujmując, z pętlą tej struktury. Czasami ta struktura jest określana w literaturze mianem struktury „EF — ręki”, ponieważ ułożenie  $\alpha$ -helisy E względem F przypomina układ palca wskazującego i kciuka w ręce człowieka.

Na mapie gęstości elektronowej  $\alpha$ -amylazy *A. niger* można wyodrębnić tylko jeden duży pik odpowiadający opisanemu, głównemu miejscu koordynacji jonu wapnia, odznaczającemu się wysokim do niego powinowactwem. Inhibicja enzymu przez nadmiar  $\text{Ca}^{2+}$  sugeruje obecność drugiego miejsca koordynacji w cząsteczce  $\alpha$ -amylazy, o mniejszym powinowactwie do tego jonu. Metody krystalograficzne pozwoliły ustalić, że drugi jon wapniowy jest przyłączany w dolnej części szczeliny wiążącej substrat przez reszty Asp206 i Glu230, obniżając w ten sposób aktywność enzymu (6).

#### 4. Mechanizm działania $\alpha$ -amylaz

Mimo różnic w budowie i końcowym składzie produktów hydrolizy substratu, wszystkie enzymy amylolityczne i to zarówno atakujące wiązania  $\alpha$ -1,4-, jak i  $\alpha$ -1,6-glikozydowe w glukanach, katalizują tę samą reakcję, przebiegającą przez stadia pośrednie, których wykrycie utrudnia krótki czas ich istnienia. Aby wyjaśnić strukturę hipotetycznego związku pośredniego, Koshland zaproponował model amylolizy przebiegającej według nukleofilowego mechanizmu podwójnego podstawienia (37). Zgodnie z tym modelem, reakcja hydrolizy wiązań glikozydowych wymagałaby powstania związku pośredniego, w którym cząsteczka enzymu tworzy wiązanie kowalencyjne o konfiguracji  $\beta$ -z węglem  $\text{C}_1$  pierścienia D-glukopiranozy przy hydrolizowanym wiązaniu. Wyniki uzyskane przy użyciu magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) (38) potwierdziły istnienie kowalencyjnego estru  $\beta$ -karboksylowego, utworzonego przez cząsteczkę enzymu i resztę glikozyłową substratu.

Porównując sekwencje aminokwasowe enzymów amylolitycznych i dokonując mutacji punktowych, ustalono również, że spośród reszt aminokwasowych w łańcuchach polipeptydowych  $\alpha$ -amylaz, bezpośredni udział w akcji katalizy biorą trzy grupy boczne aminokwasów kwaśnych, tj. dwóch reszt Asp



i jednej reszty Glu (Asp197, Asp300 i Glu233 w  $\alpha$ -amylazie trzustki wieprzowej oraz Asp206, Asp297 i Glu230 w cząsteczce Taka-amylazy *A. oryzae*) (5).

Ponieważ mechanizm hydrolizy wiązań  $\alpha$ -1,4-glikozydowych pod działaniem  $\alpha$ -amylaz zaproponowany przez Koshlanda (37) nie tłumaczy udziału tych trzech grup karboksylowych w akcji katalizy, w oparciu na badaniach krystalograficznych  $\alpha$ -amylazy trzustki wieprzowej i Taka-amylazy *A. oryzae* opracowano inny model przebiegu omawianej reakcji (39). Różni się on zasadniczo od modelu katalizy z udziałem lizozymu, jednego z pierwszych enzymów, którego mechanizm działania poznano na poziomie atomowym. Rozszczepia on wiązania glikozydowe, utworzone między węglem C<sub>1</sub> reszt kwasu N-acetylmuraminowego (NAM) a węglem C<sub>4</sub> reszt N-acetyloglukozaminy (NAG) w polisacharydowym składniku ściany komórkowej niektórych bakterii, co w efekcie prowadzi do ich lizy.

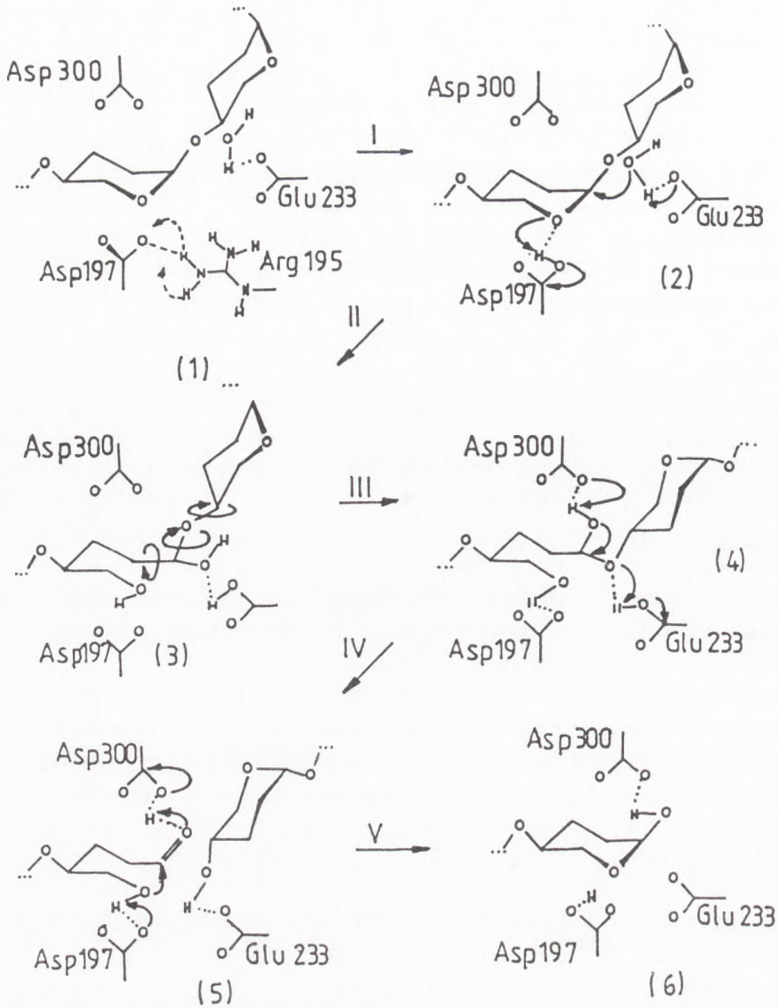
Jednym z najważniejszych etapów hydrolizy wiązania glikozydowego z udziałem lizozymu jest etap protonacji glikozydowego atomu tlenu, prowadzący do powstania jonu karboniowego. Wykazano, że podczas amylolizy stadium to nie występuje, natomiast hydroliza wiązania  $\alpha$ -1,4-glikozydowego, katalizowana przez trzy grupy karboksylowe, tworzące miejsce katalityczne  $\alpha$ -amylaz, rozpoczyna się od nukleofilowego ataku cząsteczki wody, związanej z tym miejscem i przebiega z otwarciem pierścienia piranozowego reszty glukozowej przy anomerycznym węglu C<sub>1</sub> (rys. 4).

Funkcja grupy karboksylowej Asp197 w cząsteczce  $\alpha$ -amylazy trzustki wieprzowej polega na utworzeniu wiązania wodorowego z cyklicznym tlenem reszty glukozowej, związanej w podmiejsku bezpośrednio poprzedzającym miejsce katalityczne (stan 1, rys.4). Ponieważ w tym obszarze brakuje protonu niezbędnego do powstania mostka wodorowego, jest on dostarczany do miejsca pomiędzy cyklicznym tlenem reszty glukozowej, a zjonizowaną ujemnie grupą karboksylową Asp197 (stan protonowy o niskiej energii) przez tak zwany łańcuch przeniesienia protonu. Poszczególne  $\alpha$ -amylazy różnią się między sobą zarówno składem (odmienne reszty aminokwasowe), jak i długością (liczba reszt aminokwasowych) tego łańcucha.

Stwierdzono, że w Taka-amylazie *A. oryzae* łańcuch przeniesienia katalitycznego protonu jest stosunkowo krótki i obejmuje reszty His296, Tyr82, Asp117 i Arg204, dostarczające proton na Asp206. Znacznie bardziej złożoną budowę posiada ten łańcuch w  $\alpha$ -amylazie trzustki wieprzowej. Tworząca go skomplikowana siatka wiązań wodorowych obejmuje: cztery cząsteczki wody schowane we wnętrzu cząsteczki enzymu, dwie reszty Arg zlokalizowane na powierzchni molekuly blisko regionu wiążącego substrat, dwie cząsteczki wody należące do warstwy hydratacyjnej białka, cząsteczkę wody na powierzchni enzymu oraz reszty Tyr62, Asp96 i Arg195, przekazujące proton na Asp197. Należy tu podkreślić, że właśnie układ tych czterech reszt, tj. Tyr-Asp-Arg-Asp jest prawdopodobnie zachowany we wszystkich sekwencjach  $\alpha$ -amylaz.

Po zbliżeniu się cyklicznego tlenu reszty glukozowej substratu do zjonizowanej grupy karboksylowej Asp197  $\alpha$ -amylazy trzustki wieprzowej (łańcuch boczny Asp197 rotuje wokół wiązania C $\alpha$ -C $\beta$ ), pomiędzy dwoma atomami tle-





Rys. 4. Główne etapy hydrolizy wiązania  $\alpha$ -1,4-glikozydowego pod działaniem  $\alpha$ -amylazy trzustki wieprzowej (39) (objaśnienia w tekście). Cyframi arabskimi zaznaczono kolejne stany reagujących cząsteczek; cyfry rzymskie określają etapy reakcji.

nu tworzy się stan protonowy o niskiej energii, umożliwiający ruch protonu, związanego kordynacyjnie pomiędzy Asp197 a Arg195 (stan 1, rys.4), w kierunku utworzonego minimum energetycznego. Równocześnie niedobór jonu wodorowego pomiędzy Asp197 i Arg195 uzupełnia układ transferu protonu. Związanie reszty  $\alpha$ -D-glukopiranozy substratu za pomocą powstałego wiązania wodorowego z Asp197 ułatwia nukleofilowy atak tlenu (etap I, rys.4), należącego do cząsteczki wody, związanej kordynacyjnie z Glu233, na węgiel C<sub>1</sub> rozpatrywanej reszty cukrowej (stan 2, rys.4). Jest to przyczyną pęknięcia wiązania hemiacetalowego w tej reszcie (etap II, rys.4), a zatem otwarcia pier-



ścienia glukozy (stan 3, rys.4), zmieniającego tym samym miejscową konformację substratu i wzmacniającego jego wiązanie z cząsteczką enzymu, co z kolei stanowi siłę napędową dalszych reakcji.

Rotacja wokół wiązań C<sub>1</sub>-O i O-C<sub>4</sub> (węgiel C<sub>4</sub> poprzedzającej reszty glukozy) umożliwi utworzenie mostka wodorowego pomiędzy tlenem rozrywanego wiązania glikozydowego a tlenem grupy karboksylowej Glu233 oraz ekspozycję nowo wprowadzonej do reszty cukrowej grupy hydroksylowej, związanej z jej węglem C<sub>1</sub> w kierunku grupy karboksylowej Asp300 (etap III, rys.4), dająca w rezultacie powstanie kolejnego mostka wodorowego (stan 4, rys.4). Wynikiem obu tych protonacji jest rozpad wiązania  $\alpha$ -1,4-glikozydowego (etap IV, rys.4). Nowo powstały nieredukujący koniec jednej z dwóch uwolnionych cząsteczek produktów pozostaje chwilowo związany wiązaniem wodorowym z Glu233 (stan 5, rys.4). Węgiel C<sub>1</sub> utworzonego końca redukującego drugiej z cząsteczek produktów, zaangażowany w powstałą na skutek rozpadu wiązania glikozydowego grupę karbonylową, związaną wiązaniem wodorowym z Asp300, ulega nukleofilowemu atakowi atomu tlenu związanego z węglem C<sub>5</sub> (etap V, rys.4), co doprowadza do ponownego zamknięcia pierścienia glukopiranozy (stan 6, rys.4). Ustalona pozycja atomu tlenu zanikającej w ten sposób grupy karbonylowej (związanej mostkiem wodorowym z Asp300) gwarantuje właściwy kierunek ataku nukleofilowego oraz konfigurację redukującego końca uwolnionej cząsteczki produktu.

Przedstawiona hipoteza przebiegu hydrolizy wiązania glikozydowego, opracowana na podstawie wyników badań krystalograficznych, jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR), eksperymentów kinetycznych oraz mutacji punktowych w obrębie centrum aktywnego niektórych  $\alpha$ -amylaz, jak się wydaje w najpełniejszy sposób ukazuje zarówno funkcjonowanie poszczególnych reszt aminokwasowych łańcucha polipeptydowego tych enzymów w akcie katalizy, jak i zmiany zachodzące w cząsteczce substratu.

Ustalenie budowy przestrzennej  $\alpha$ -amylaz innych niż dotąd poznane, być może wykaże uniwersalność proponowanego mechanizmu hydrolizy wiązań  $\alpha$ -1,4-glikozydowych pod działaniem tych enzymów, niewątpliwie zaś pozwoli ustalić różnice struktury łańcuchów przeniesienia protonu w obrębie omawianej grupy hydrolaz glikozydowych.

## Literatura

1. *Handbook of Amylases and Related Enzymes*, (1989), Ed. by The Amylase Research Society of Japan, Pergamon Press.
2. Vihinen M., Mantsala P., (1989), *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 24, 329-405.
3. Takasaki Y., (1987), *Agric. Biol. Chem.*, 51, 9-13.
4. Buisson G., Duee E., Haser R., Payan F., (1987), *EMBO J.*, 6, 3909-3916.
5. Matsuura Y., Kusunoki M., Harada W., Kakudo M., (1984), *J. Biochem.*, (Tokyo), 95, 697-702.
6. Boel E., Brady L., Brzozowski A. M., Derewenda Z., Dodson G. G., Jensen V. J., Petersen S. B., Swift H., Thim L., Woldlike H. F., (1990), *Biochemistry*, 29, 6244-6299.



7. Hofman B. E., Bender H., Schultz G. E., (1989), *J. Mol. Biol.*, 209, 793-800.
8. Klein C., Schultz G. E., (1991), *J. Mol. Biol.*, 217, 737-750.
9. Binder F., Huber O., Bock A., (1986), *Gene*, 47, 269-277.
10. MacGregor E. A., Svensson B., (1989), *Biochem. J.*, 259, 145-152.
11. Raimbaud E., Buleon A., Perez S., Henrissat B., (1989), *Int. J. Biol. Macromol.*, 14, 217-225.
12. MacGregor E. A., (1988), *J. Protein Chem.*, 7, 399-415.
13. Watanabe K., Kitamura K., Iha H., Suzuki Y., (1990), *Eur. J. Biochem.*, 192, 609-620.
14. Svensson B., Jespersen H., Sierks M. R., MacGregor E. A., (1989), *Biochem. J.*, 264, 309-311.
15. Jespersen H. M., MacGregor E. A., Sierks M. R., Svensson B., (1991), *Biochem. J.*, 280, 51-55.
16. MacGregor E. A., (1993), *Starch*, 45, 232-237.
17. Mikami B., Sato M., Shibata T., Hirose M., Aibara S., Katsube Y., Morita Y., (1992), *J. Biochem.*, 112, 541-546.
18. Aleshin A., Golubev A., Firsov L. M., Honzatko R. B., (1992), *J. Biol. Chem.*, 267, 192-198.
19. *Textbook of Biochemistry*, (1992), Ed. T. M. Devlin, New York, 58-59.
20. Mercier C., Colonna P., (1988), *8<sup>th</sup> International Biotechnology Symposium, Proceedings*, Ed. Durand et al., Paris, vol. 2, 1042-1054.
21. Holm L., Koivula A. K., Lektovaara P. M., Hemminki A., Knowles J. K. C., (1990), *Protein Eng.*, 3, 181-191.
22. Amemura A., Charakraborty R., Fujita M., Noumi T., Futai M., (1988), *J. Biol. Chem.*, 263, 9271-9275.
23. Baecker P. A., Greenbegr E., Preiss J., (1986), *J. Biol. Chem.*, 261, 8738-8743.
24. Kuriki T., Park J. H., Imanaka T., (1990), *J. Ferment. Bioeng.*, 69, 204-210.
25. Katsuragi N., Takizawa N., Murooka Y., (1987), *J. Bacteriol.*, 169, 2301-2306.
26. Kuriki T., Imanaka T., (1989), *J. Gen. Microbiol.*, 135, 1521-1528.
27. Melasnemi H., Palcheimo M., Hemio L., (1990), *J. Gen. Microbiol.*, 136, 447-454.
28. Candussio A., Schmidt G., Bock A., (1990), *Eur. J. Biochem.*, 191, 177-185.
29. Hoefslot L.H., Hoogeveen-Westerveld M., Kroos M. A., van Beeumen J., Reuser A. J. J., Oosta B. A., (1988), *EMBO J.*, 7, 1697-1704.
30. Hutny J., (1979), *Post. Biochem.*, 25, 533-546.
31. Ajandouz E.-H., Abe J., Svensson B., Marchais-Maureu G., (1992), *Biochim. Biophys. Acta*, 1159, 193-202.
32. Kim C. H., Kho Y.-H., (1993), *Biochim. Biophys. Acta*, 1202, 200-206.
33. Kim C. H., Kwon S. T., Taniguchi H., Lee D. S., (1992), *Biochim. Biophys. Acta*, 1122, 243-250.
34. Hayashida S., Nomura T., Yoshino E., Hongo M., (1978), *Agric. Biol. Chem.*, 40, 146-149.
35. Hayashida S., Kunisaki S. J., Nakao M., Flor P. Q., (1982), *Agric. Biol. Chem.*, 46, 89-93.
36. Babu K. R., Satyrnrayana T., (1993), *Enz. Microb. Technol.*, 15, 1066-1069.
37. Fisher E.H., Stein E.A., (1960), *The Enzymes*, Eds. P. D. Boyer et al., Acad. Press, 2<sup>nd</sup> ed., 340.
38. Tao B. Y., Reilly P. J., Robyt J. F., (1989), *Biochim. Biophys. Acta*, 995, 214-220.
39. Mazur A. K., Haser R., Payan F., (1994), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 204, 297-302.
40. Stryer L., (1986), *Biochemia*, PWN, Warszawa, 162-176.



## The structure and the catalytic mechanism of $\alpha$ -amylases

### Summary

The review presents the results of recent studies on the multidomain structure of  $\alpha$ -amylases and the mechanism of splitting of  $\alpha$ -1,4-glycosidic bond catalysed by these enzymes. The model of the catalytic domain A of  $\alpha$ -amylases as well as the localisation and the way of binding of calcium ions are also described.

### key words:

$\alpha$ -amylases, catalytic mechanism of  $\alpha$ -amylases.

### *Adres do korespondencji:*

Halina Kalinowska, Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka,  
ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź.