



〈原著〉

臨床検査用酵素の立体構造的解釈： リンゴ酸デヒドロゲナーゼと乳酸デヒドロゲナーゼの 基質特異性の違いについて

下澤 勇弥^{1,2)}、氷見山 幹基²⁾、中村 努²⁾、西矢 芳昭^{1,3)}

Structural analysis of diagnostic enzymes: Differences in substrate specificity between malate dehydrogenase and lactate dehydrogenase

Yuya Shimozawa^{1,2)}, Tomoki Himiyama²⁾, Tsutomu Nakamura²⁾ and Yoshiaki Nishiya^{1,3)}

Summary Malate dehydrogenase (MDH) and lactate dehydrogenase (LDH) are widely used as components in diagnostic tests. Both enzymes belong to the α -keto acid dehydrogenase family and both enzymatic reactions and enzyme structures are extremely similar. However, only MDH exhibits absolute substrate specificity, with LDH accepting a broad range of substrates. In this study, the difference in substrate specificity between MDH and LDH from *Geobacillus stearothermophilus* was investigated through structural analysis. The structural analysis highlighted the importance of three elements of the active site: (1) In the active site of the apo structure, only MDH has a positively charged pocket creating an electrostatically charged, high affinity region for the substrate oxaloacetate; (2) The catalytic residue of MDH causes a switch to the reactive, closed

¹⁾ 摂南大学大学院理工学研究科生命科学専攻

〒572-8508 大阪府寝屋川市池田中町17-8

²⁾ 国立研究開発法人産業技術総合研究所バイオメ
ディカル研究部門

〒563-8577 大阪府池田市緑丘1-8-31

³⁾ 摂南大学理工学部生命科学科
〒572-8508 大阪府寝屋川市池田中町17-8

¹⁾ Division of Life Science, Graduate School of Science
and Engineering, Setsunan University, 17-8 Ikeda-
Nakamachi, Neyagawa, Osaka 572-8508, Japan.

²⁾ National Institute of Advanced Industrial Science and
Technology, 1-8-31 Midorigaoka, Ikeda, Osaka
563-8577, Japan.

³⁾ Department of Life Science, Faculty of Science and
Engineering, Setsunan University, 17-8 Ikedanaka-
machi, Neyagawa, Osaka 572-8508, Japan.

連絡先: 西矢芳昭

摂南大学理工学部生命科学科

Tel: +81-72-800-1151

Fax: +81-72-838-6599

E-mail: nishiya@lif.setsunan.ac.jp

連絡先: 中村努

国立研究開発法人産業技術総合研究所バイオメ
ディカル研究部門

Tel: +81-72-751-9272

E-mail: nakamura-t@aist.go.jp

受付日: 2021年11月19日

採択日: 2021年12月17日

conformation, upon substrate binding, whereas LDH remains constantly in a reactive conformation; (3) The active site mobile loop of MDH shows lower flexibility compared to that of LDH, confirming that the conformational change of MDH is induced by oxaloacetate binding and does not occur spontaneously. This indicates that the substrate specificity is determined by the occurrence of the open-closed active site conformational change in MDH. In contrast, the simple reaction mechanism of LDH, which does not involve an open-closed active site conformational change, allows this enzyme to accept a broader range of α -keto acids as substrates, including oxaloacetate and pyruvate.

Key words: Malate dehydrogenase, Lactate dehydrogenase, Substrate specificity, Conformational change, Molecular dynamics

1. 緒言

酵素反応の高基質特異性は産業利用の大きな利点だが、その必要性は分野によって大きく異なる。例えば、医薬品などの合成では立体選択性が重要で、それ以外の基質特異性は低い方がさまざまな原料との反応が起こり、合成できる化合物が増えて好都合である。一方、臨床検査用酵素の基質特異性は、医療に関わる生化学検査値の精密性に直接影響を与えるため、厳密なレベルを必要とする場合が多い。

このことを端的に示す事例のひとつとして、腎機能マーカーのクレアチニン測定がある。クレアチニン測定用酵素サルコシンオキシダーゼは、サルコシン以外にL-プロリンにも若干反応する¹⁾が、その程度はサルコシンに対して k_{cat} 値で約2.0%、触媒効率で約0.065%とけっして高くはない²⁾。しかし、大澤らによりサルコシンオキシダーゼのL-プロリン反応性はクレアチニン測定に精度に影響を与えることが確認された³⁾。そのため、L-プロリン反応性がサルコシンに対して k_{cat} 値で0.49%（野生型の約1/4）、触媒効率で0.0083%（野生型の約1/8）に低下したサルコシンオキシダーゼ多重変異体がタンパク質工学技術により開発された²⁾。本多重変異酵素は、現在もクレアチニン測定に活用されている。

酵素の基質特異性を理解するためには、立体構造からの解釈が欠かせない。酵素反応は、活性部位のみならず酵素全体の動的作用により厳密に制御されていると思われる。しかし、基質

認識の議論は専ら酵素-基質結合構造の予測に基づく静的解析を中心に行われている。酵素-基質結合様式、いわゆる鍵穴+鍵の考え方だけでは基質選択機構の解明は難しい。上述のサルコシンオキシダーゼについても、変異による基質特異性の改良に成功したものの、変異効果の立体構造に基づく明確な解釈はできていない²⁾。

本研究では、代表的な臨床検査用酵素であるリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (MDH) と乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) の基質特異性の違いについて、立体構造に基づく合理的な解釈を試みた。MDHとLDHは α -ケト酸デヒドロゲナーゼファミリーに属し、共に生物の代謝で重要な役割を果たすため、古くから反応機構に関する数多くの研究が為された。リガンドとの複合体の結晶構造解析も種々成功しており、活性部位とリガンドとの結合様式から基質選択機構が説明されている。これらの成果に基づいたタンパク質工学的改良についても、多くの報告がある。最も有名で劇的な成功例は、LDHの1アミノ酸置換によるMDH化である。ピルビン酸に反応するLDHとオキサロ酢酸に反応するMDHは、活性中心の共通部位に「特異性残基」と呼ばれるグルタミン (Q) とアルギニン (R) がそれぞれ保存されている。Holbrookらは中等度好熱菌*Geobacillus stearothermophilus*由来LDH (gs-LDH) のQをRに置換することでMDH化されたgs-LDH変異体、すなわちピルビン酸反応性からオキサロ酢酸反応性へと最適基質が大きく変化した改変酵素を開発した (Fig. 1)⁴⁾。他起原のLDHでも、この方法によるMDH化は成功し

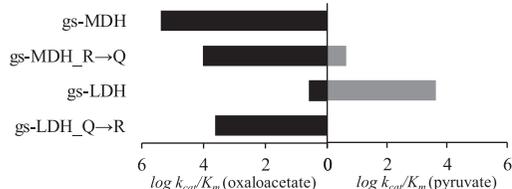


Fig. 1 MDH and LDH activities of wild-type and mutant enzymes. The K_m (mM) and k_{cat} (s^{-1}) values were cited from ref. 4 and 9.

た。しかしながら、同様の戦略でMDHのRをQに置換する研究も種々行われたが、いずれもLDH化は不成功に終わった (Fig. 1)^{5,6)}。その理由については、現在も不明のままである。

このように、多くの知見を有するMDHとLDHにおいてすら基質を認識・選択し反応するメカニズムが解明されていない。また、一般にLDHはMDHに比べて低基質特異性であることが知られている (Fig. 1)⁷⁾。このことは、臨床検査分野では分析精度の点から留意されているが、差異の理由を全く説明できていない。そして、上述のMDH化gs-LDHはタンパク質工学での合理的な開発の素晴らしい成果だが、基質特異性が厳密ではなくピルビン酸にも微弱な反応が見られること、アロステリック・エフェクターが必要なことなど基本性能に短所が多く、結局のところ実用化できていない⁷⁾。反応メカニズムに基づく実用的な基質特異性の改変は、タンパク質工学が発展した現在でも最も難易度の高い課題のひとつである。

われわれは、臨床検査用酵素である*G. stearothermophilus*由来MDH (gs-MDH)^{7,8)}を用いた諸条件での結晶構造解析により、その触媒反応サイクルにおける各段階に対応した4種類の結晶構造 [酵素単独、酵素+補酵素、酵素+補酵素+基質 (open構造)、酵素+補酵素+基質 (closed構造)] の決定に成功した⁹⁾。さらに、それらの構造の比較により、closed構造での酵素反応に至る詳細な構造変化メカニズムが解明された (Fig. 2)^{9,10)}。これらの知見は、gs-MDHの高基質特異性の理由を明確にし、MDHとLDHの基質特異性の違いを知る手がかりとなった。

本論文では、なぜMDHがLDHよりも高基質特異性なのかを、立体構造とその動的解析から明らかにする。結果として、以下の3要素の重

要性が示唆された。

(1) open構造 (apo酵素) における活性部位の電荷: apo型MDHは活性部位に正電荷ポケットを有したが、apo型LDHの活性部位は電荷の偏りがほとんどなかった。

(2) 触媒残基であるヒスチジン (H) の動き: MDHはopen構造からclosed構造への変化の際に触媒残基の活性型へのswitching (配向の変化) が起こったが、LDHは構造変化と関係無く触媒残基側鎖は常に基質と反応し得る配向を示した。

(3) 構造変化における活性部位の可動ループの柔軟性: MDHの可動ループはLDHと比べ柔軟性が低く、自発的なopen-closed変換が起きにくいと推察された。

(1) により、MDHの活性部位は負電荷が強いオキサロ酢酸に親和性が高い。また、オキサロ酢酸の結合で正電荷が中和され反応が低減されることにより、closed構造への移行が進む。

(2) により、MDHはclosed構造への変換と反応開始が連動するため、基質特異性が厳密化される。一方、switchingの仕組みを持たないLDHは、open構造でも基質と反応し得る。(3) により、MDHのclosed構造への変換は可動ループと基質との相互作用が重要で、ループを閉じるためには強い相互作用を示すオキサロ酢酸が有利となる。

II. 材料及び方法

1. 立体構造解析およびモデリング

open構造の分子表面電荷分布比較、立体構造の重ね合わせなどの解析は、ソフトウェアMOE (ver 2019.01, Chemical Computing Group Inc., Montreal, Canada) を用いて行った^{11,12)}。gs-LDHの可動ループのSegment Matching法によるモデリングは、MOEのLoop Modeler programを用いた。酵素および基質化合物の立体構造は、データベースProtein Data Bank (<http://www.rcsb.org>) およびPubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) よりそれぞれ得た。

2. 分子動力学解析

分子構造の解析前処理として、テンプレート立体構造はMOEのQuick Prep programを用いて

プロトンおよび電荷の付加を行った。シミュレーションは、MOEのMolecular dynamics (MD) program を用いて実行した。MDシミュレーションの力場は、Amber10:EHTを使用し、温度条件は303 Kに設定した。平均二乗偏差 (RMSD) 値は、各酵素の可動ループに対して算出した。open構造のMDシミュレーションは、apo型のgs-MDH (PDB ID: 7BY8)⁹⁾、*Lactobacillus casei* LDH (PDB ID: 2ZQZ, lc-LDH)¹³⁾、*Thermus thermophilus* LDH (PDB ID: 4A73, tt-LDH)¹⁴⁾ の各結晶構造、およびgs-LDH結晶構造 (PDB ID: 1LDB)¹⁵⁾ より作成したモデル (本研究にて可動ループのモデリングを行った構造) を基にそれぞれ実施した。closed構造のMDシミュレーションは、gs-MDH (PDB ID: 7BYC)⁹⁾ およびgs-LDH (PDB ID: 1LDN)¹⁶⁾ の各結晶構造を基にそれぞれ実施した。基質非存在下のMDシミュレーションは、各closed構造に対しQuick Prep programの実行後、リガンドを削除した構造を用いてそれぞれ実施した。

Ⅲ．結果及び考察

1. apo酵素の活性部位比較

まず、基質結合前の状態であるapo酵素の活性部位について、MDHとLDHを比較した。gs-LDHを含む多くのLDHのopen構造 (apo型構造) は、可動ループの位置を特定できず、それらの

結晶構造からは活性部位の電荷分布はわからない。具体的には、PDBに登録されているapo型構造LDHの構造数23 (gs-LDHとのアミノ酸配列相同性が45%以上) のうち、16は可動ループの位置を特定できていない。そこで、可動ループが明瞭に観察されているlc-LDHの結晶構造を用いた。また、gs-LDHの可動ループは、PDB登録されている相同配列の部分構造を基にSegment Matching法によるループモデリングで予測した。

結果として、gs-MDHの活性部位は、既報の通りR86、R92、N124、R155、H179およびK215の各アミノ酸残基で明確な正電荷ポケットが構成されていた (Fig. 3)⁹⁾。一方、lc-LDHの活性部位はQ100、R106、N138、R169、H193、Y238およびD235、gs-LDHの活性部位はQ102、R108、N140、R171、H195、Y240およびD235でそれぞれ構成されており、どちらも正電荷ポケットは形成されていなかった (Fig. 3)。したがって、gs-MDHの活性部位は正電荷ポケットの効果として、負電荷が弱いピルビン酸よりも負電荷が強いオキサロ酢酸に対する親和性が高く、その結合により基質ポケット内で反発する正電荷の中和と構造変化の促進が予想される。一方、両LDHの活性部位は基質結合ポケット内の電荷による反発が弱く、結合基質の選択性も低い。また、基質ポケット内での電荷の反発が弱いため、gs-MDHよりopen-closed構造変化が起こりやすいと推察される。

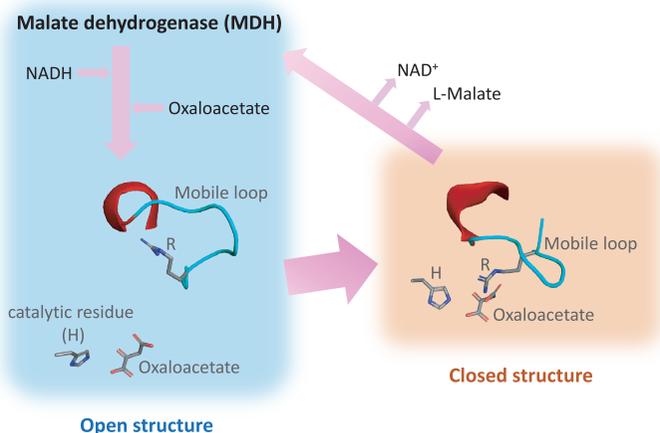


Fig. 2 Reaction cycle of MDH. The schematic drawing summarizes based on the data in ref. 9.

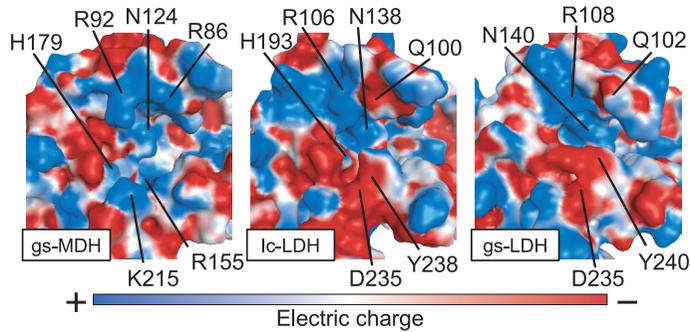


Fig. 3 Surface charge maps on the active sites of MDH and LDH. Surface charges are shown in blue for positive and red for negative. R169 of lc-LDH and R171/H195 of gs-LDH are covered with Y238 and Y240, respectively.

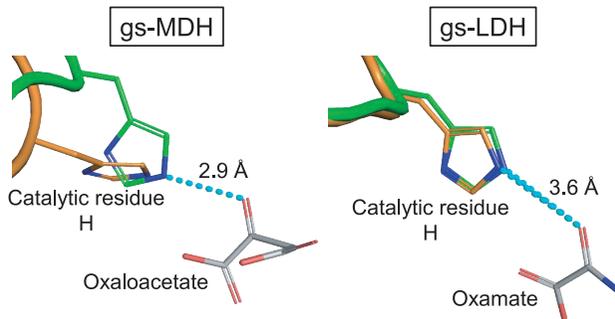


Fig. 4 The catalytic residue conformations of the open and closed structures of MDH and LDH. The catalytic residues (H) in open and closed structures are shown in orange and green, respectively. Oxamate is an analog of lactate.

2. 触媒残基Hの配向の比較

次に、反応の触媒残基Hについて、gs-MDHとgs-LDHの構造変化に伴う側鎖の配向を比較した。われわれはgs-MDHのX線結晶構造解析より、open構造からclosed構造への変換に伴い、触媒残基の配向が反応型にswitchingすることを発見した (Fig. 4)⁹⁾。しかしながら、gs-LDHの触媒残基はopen構造とclosed構造 (PDB ID: 1LDB 1LDN) で同じ配向を示し、構造変化に関わらず常に基質の α -ケト基と水素結合が可能な位置に向いていた (Fig. 4)。したがって、gs-LDHはopen構造でも見かけ上触媒反応が可能であり、基質による構造変化の誘導は必須でないことを示唆している。鈴木らは、ウサギ心

筋由来LDHにおける触媒反応過程を*in silico*解析し、open構造でも反応が起こり得ることを計算科学で示した¹⁷⁾。本研究での触媒残基の比較結果は、この報告に構造的解釈を与えた。

gs-LDHの触媒残基はswitching機能を持たないことが判明したが、他の細菌由来LDHについてもswitching機能を確認した。7種のLDHについて、各触媒残基の配向を比較した結果、すべてのLDHのopen構造がgs-MDHのclosed構造と同じ触媒残基の配向を示した (Fig. 5A)。すなわち、LDHは共通の性質として触媒残基switching機能を持たないと考えられた。一方、6種の細菌由来MDHのopen構造を比較すると、2種の高度好熱菌*Thermus*由来MDHの触媒残基はgs-MDHのclosed構造と同じ配向を示し、残り4種はgs-

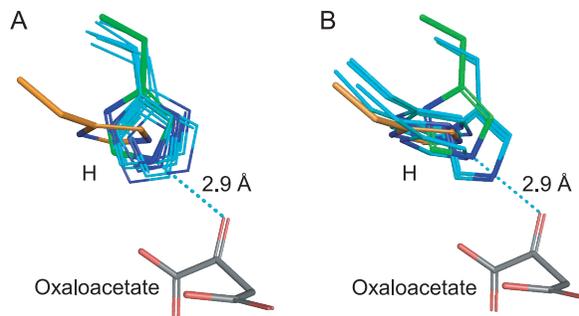


Fig. 5 Catalytic residue comparison of various bacterial MDH and LDH. The catalytic residues (H) of gs-MDH in open and closed structures are shown in orange and green, respectively. A: Comparison of gs-MDH and bacterial LDHs (cyan). Catalytic residues of LDHs from *G. stearothermophilus* (PDB ID: 1LDN), *Bifidobacterium longum* (1LLD), *Clostridium thermocellum* (1Y6J), *Deinococcus radiodurans* (2V6B), *T. thermophilus* (2V6M), *L. casei* (2ZQZ) and *Bacillus subtilis* (3PQE) are superposed. B: Comparison of gs-MDH and other bacterial MDHs (cyan). Catalytic residues of MDHs from *Chlorobaculum tepidum* (1GUZ), *T. thermophilus* (1IZ9), *T. flavus* (1WZI), *B. anthracis* (3TL2), *Methylobacterium extorquens* (4ROR) and *Thermaerobacter marianensis* (7AOB) are superposed.

MDHのopen構造と同じ配向を示した (Fig. 5B)。このことから、触媒残基のswitching機能は、多くのMDHの高基質特異性の要因と推察される。

3. 可動ループの分子動力学解析

gs-MDHおよびgs-LDHの活性部位表面の電荷分布比較から、LDHは可動ループと基質結合ポケット間の電荷の反発が弱く、MDHと比べclosed状態に移行しやすいと示唆された。しかし、酵素の表面電荷はpHや基質濃度の影響を受け易いため、構造変化制御の要因としては不十分と思われる。すなわち、構造変化は表面電荷のみならず他の要因によっても制御されると考えるのが合理的である。われわれは、MDHとLDHのopen-closed変換には活性部位の可動ループの柔軟性も影響すると考えた。そこで、分子動力学 (MD) シミュレーションによりMDHとLDHの可動ループの柔軟性を調べた (Fig. 6)。gs-LDHのopen構造は、Segment Matching法により可動ループを予測した構造を使用した。また、lc-LDHおよびtt-LDHの結晶構造についてもMD

シミュレーションを実施した。各MDシミュレーションから、値が安定化する100 ~ 500 psの平均RMSD値を算出し、比較した。

open構造におけるgs-MDH、gs-LDH、lc-LDHおよびtt-LDHの可動ループの平均RMSD値は、それぞれ1.2、1.5、1.9 および1.6 Åであった (Fig. 6A)。常温菌由来であるlc-LDHの値が最も高く、次いで好熱菌由来であるgs-LDHとtt-LDHがgs-MDHよりも高い値を示したことから、open構造におけるgs-MDHの可動ループは最も柔軟性が低いと示唆された。

gs-MDHおよびgs-LDHの基質存在下のclosed構造における平均RMSD値は、それぞれ1.1および1.5 Åであった (Fig. 6B)。closed構造では、結合するリガンドの違いによる相互作用の差が可動ループの柔軟性に影響すると予想された。そこで、基質非存在下でのclosed構造のMDシミュレーションも実施した。その結果、gs-MDHおよびgs-LDHの平均RMSD値は、それぞれ1.5および1.8 Åであった (Fig. 6C)。

以上のように、すべての条件においてgs-

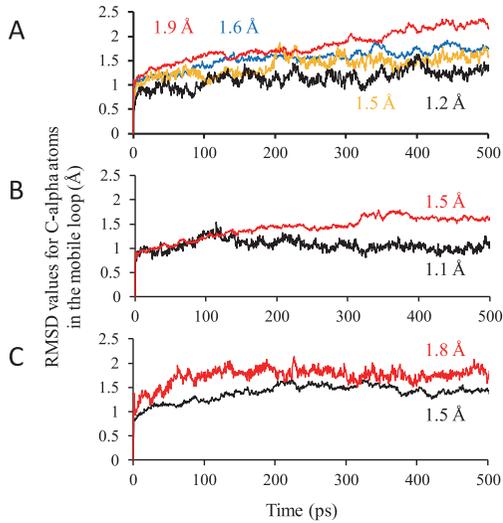


Fig. 6 MD simulations of MDH and LDH. RMSD values were calculated for the mobile loop of each enzyme, and the averages of 100.05 to 500.0 ps are shown. A: Apo structures of gs-MDH (black), lc-MDH (red), gs-LDH (blue), and tt-LDH (yellow). B: Closed structures of gs-MDH (black) and gs-LDH (red) in the presence of ligand. C: Closed structures of gs-MDH (black) and gs-LDH (red) in the absence of ligand.

MDHの可動ループは、LDHの可動ループよりも低い平均RMSD値を示し、相対的に柔軟性の低い構造と示唆された。この低柔軟性のため、gs-MDHは可動ループが閉じた構造、すなわちclosed構造に自発的にはなり難い。そして、オキサロ酢酸は2つのカルボキシ基によって可動ループと基質結合ポケットを静電的に架橋できるため、closed構造へと導く駆動力となる。このことにより、オキサロ酢酸との選択的な反応が実現し、高い基質特異性を示すと考えられる。

Ⅳ．結語

本研究では、MDHとLDHの基質特異性の違いについて、立体構造に基づき解釈した。apo酵素の比較では、LDHの活性中心と比べgs-MDHは負電荷基質との結合に有利な正電荷の偏りを示した。酵素反応を直接制御する触媒残基Hのswitchingは、MDH特有の特性として広く

観察された。MDシミュレーションにより確認されたMDHの可動ループの低柔軟性は、構造変化に基質との強い相互作用が必要であることを示しており、LDHの可動ループの柔軟性と顕著に異なっていた。以上の結果は、gs-MDHとgs-LDHの変異体特性 (Fig. 1) にも構造的解釈を与えた。MDHのR→Q置換変異体は、活性中心の電荷とclosed構造における基質結合空間をピルビン酸に有利な状態に変化させるが、触媒残基のswitchingによる反応制御は依然として働く。可動ループの柔軟性も低いままである。結果として、オキサロ酢酸に対しては親和性や可動ループとの相互作用の低下により反応性が低下し、ピルビン酸に対しては親和性が上昇するが構造変化の誘導力が低いため低反応性に留まる。一方gs-LDHのQ→R変異体は、高負電荷基質に対する親和性を上昇させ、オキサロ酢酸に対する反応性が向上する。しかし、ピルビン酸に対する親和性は相対的に低下する。

Fig. 7に、gs-MDHとgs-LDHの活性部位の構造変化モデルを示す。可動ループを繋ぐバネの数は、柔軟性の高低を表している。MDHのopen構造は、正電荷の反発と可動ループの低柔軟性のためclosed構造に変換し難く、触媒残基のスイッチもオフである。カルボン酸を2つ持つオキサロ酢酸が結合することにより、可動ループが閉じてclosed構造となり、触媒残基スイッチがオンに変換し反応が起こる。一方、LDHにはこのような複雑なステップがなく、電荷は偏っておらずループも動きやすい。さらに、触媒残基は常にスイッチがオンである。

結晶構造の比較により、活性中心の電荷、触媒残基のswitchingおよび可動ループの柔軟性が、両酵素の基質特異性を分ける構造的要素であると明らかになった。これらに加えて、両酵素のclosed構造におけるコンパクトな基質結合空間は、一般的な酵素-基質複合体における基質選択として重要であり、合計4要素の協同効果がMDHの高基質特異性獲得戦略となる。これらMDHの協同効果は複雑な機構により制御されているため、変異により反応性が低下しやすい。一方、LDHのシンプルな反応機構は基質特異性を相対的に低下させるが、変異による改変が容易となる。MDHの高基質特異性の構造的理解は、極めて特異的な臨床検査用酵素の

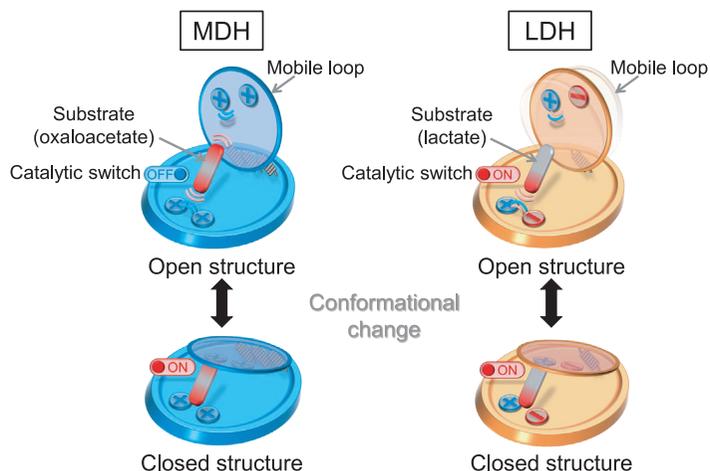


Fig. 7 Open-closed conformational change model of MDH and LDH. Springs indicate the flexibility of the mobile loop.

開発に向けた機能改変デザインの理論的基盤となるものと期待される。

本論文内容に関連する著者の利益相反：なし

謝辞

本研究の一部は、JSPS科学研究費補助金（科研費）18KT06616の助成を受けたものである。

文献

- 1) Nishiya Y, Nakano S, Kawamura K, and Abe Y: Monomeric sarcosine oxidase acts on both L- and D-substrates. *J Anal Bio-Sci*, 35: 426-430, 2012.
- 2) Nishiya Y and Kishimoto T: Alteration of L-proline oxidase activity of sarcosine oxidase and a structural interpretation. *J Anal Bio-Sci*, 33: 161-166, 2010.
- 3) Ohsawa S, Muto T, Mamada K, Yoshida T, Iida S, and Yonemitsu H: Evaluation of an enzymatic reagent for the determination of creatinine [Jpn]. *J Anal Bio-Sci*, 17: 332-337, 1994.
- 4) Wilks HM, Hart KW, Feeney R, et al.: A specific, highly active malate dehydrogenase by redesign of a lactate dehydrogenase framework. *Science*, 242: 1541-1544, 1988.
- 5) Goward CR and Nicholls DJ: Malate dehydrogenase: A model for structure, evolution, and catalysis. *Protein Sci*, 3: 1883-1888, 1994.
- 6) Nishiya Y and Hirayama N: Molecular modeling and substrate binding study of the *Bacillus stearothermophilus* malate dehydrogenase. *J Anal Bio-Sci*, 23: 117-122, 2000.
- 7) Shimozawa Y and Nishiya Y: Malate dehydrogenase of *Geobacillus stearothermophilus*: A practically feasible enzyme for clinical and food analysis. *Int J Anal Bio-Sci*, 7: 59-67, 2019.
- 8) Nishiya Y and Shimozawa Y: Properties of *Geobacillus stearothermophilus* malate dehydrogenase used as a diagnostic reagent and its characterization by molecular modeling. *Int J Anal Bio-Sci*, 4: 21-27, 2016.
- 9) Shimozawa Y, Himiyama T, Nakamura T, and Nishiya Y: Structural analysis and reaction mechanism of malate dehydrogenase from *Geobacillus stearothermophilus*. *J Biochem*, 170: 97-105, 2021.
- 10) Shimozawa Y, Himiyama T, Nakamura T, and Nishiya Y: Increasing loop flexibility affords low-temperature adaptation of a moderate thermophilic malate dehydrogenase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Protein Eng Des Sel*, in press.
- 11) Sumida Y, Yamasaki M, Nishiya Y, Kumagai S, Yamada T, and Azuma M: Protein engineering of D-succinylase from *Cupriavidus* sp. for D-amino acid synthesis and the structural implications. *Adv Synth Catal*, 363: 4770-4778, 2021.
- 12) Nishiya Y: Structural prediction of 2-chloro-4-nitrophenyl-4-O- β -D-galactopyranosylmaltoside binding in the active site of human pancreatic α -amylase [Jpn]. *J Anal Bio-Sci*, 44: 83-88, 2021.
- 13) Arai K, Fushinobu S, Ishimitsu T, Matsuzawa H, Taguchi H, and Uchikoba H: Active and inactive state structures of unliganded *Lactobacillus casei* allosteric

- L-lactate dehydrogenase. *Proteins*, 78: 681-694, 2010.
- 14) Aleksandrov A, Colletier JP, Coquelle N, De Mendoza-Barbera E, Field M, Madern D, and Mraihi S: Sampling the Conformational Energy Landscape of a Hyperthermophilic Protein by Engineering Key Substitutions. *Mol Biol Evol*, 29: 1683-1694, 2012.
- 15) Chakrabarti P, Piontek K, Rossmann MG, Schar HP, and Zuber H: Structure determination and refinement of *Bacillus stearothermophilus* lactate dehydrogenase. *Proteins*, 7: 74-92, 1990.
- 16) Dodson EJ, Gamblin SJ, Holbrook JJ, Muirhead H, Piontek K, Turkenburg JP, and Wigley DB: Structure of a ternary complex of an allosteric lactate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* at 2.5 Å resolution. *J Mol Biol*, 223: 317-335, 1992.
- 17) Suzuki K, Maeda S, and Morokuma K: Roles of closed- and open-loop conformations in large-scale structural transitions of l-lactate dehydrogenase. *ACS Omega*, 4: 1178-1184, 2019.