

強力な抗酸化物質ヒドロキシチロソールの生産基盤開発

北海道大学大学院工学研究院

佐藤 康治

Hydroxytyrosol (HT) obtained from olives is an antioxidant with multiple health benefits for human. Because of its low content in olives, fermentative processes with engineered microorganisms have been developed as alternative sources. We for the first time succeeded in HT production from glucose with *Escherichia coli* engineered an artificial pathway employed tyrosine (Tyr) hydroxylase (TyrH), dihydroxyphenylalanine (DOPA) decarboxylase (DDC), and monoamine oxidase (MAO). In the pathway, central metabolic Tyr is converted into HT as follows: (i) hydroxylation of Tyr by TyrH, (ii) decarboxylation of DOPA by DDC, (iii) oxidation of dopamine by MAO, and (iv) reduction of dihydroxyphenylacetaldehyde by endogenous alcohol dehydrogenase(s). However, the productivity was quite low. For high HT production, enhanced Tyr-supply in the cells is needed. Here, we established a Tyr-supplying pathway using a bacterial phenylalanine (Phe) hydroxylase together with a cofactor-recycling system in *E. coli* and the titers of Tyr reached 2.9 g/L from Phe. Even though the strain was applied to the HT production, the productivity was still low unexpectedly. We therefore need further improvements to accomplish practical HT production.

1. 緒言

ヒドロキシチロソール (HT、図1) は、オリーブなどに含まれる強力な抗酸化物質で、その効果はビタミンCの10倍ともいわれる。抗酸化作用のほか、抗炎症・抗菌作用、メラニン産生や紫外線によるDNA損傷の抑制効果などが知られ、化粧品やスキンケア用品の有効成分として使用されている^{1,2)}。また、体の外側からだけでなく、美肌やアンチエイジング効果が期待されるサプリメントとして、内側からのケアにも利用されている。さらに抗ウイルス活性も知られており、最近では現在パンデミックを引き起こしている新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の感染予防効果が注目されている³⁾。

我々はHTを食事から摂取している。主な摂取源はバージンオリーブオイルであるが、含有量が低いため十分な健康効果が得られておらず、近年の健康志向の高まりもあり、食品添加物やサプリメントとしての利用が拡大している。現在は、オリーブ果汁や葉エキスの濃縮物が使用されている。しかし、含有量の低さ、不純物の混在、個体・栽培エリアによるバラつき、季節性などから、高純度での配合や通年の安定供給に課題がある。また、HTはオレウロペインの部分構造として生成されるため (図1)、加水分解し遊離する必要があるため、製造工程をより煩雑にする²⁾。高純度品も販売されているが、化学合成品で非常に高価なだけ

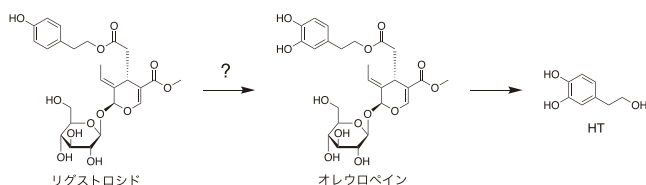
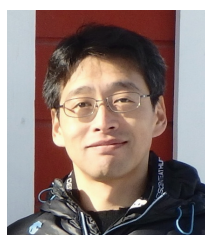


図1 オリーブにおける HT 生合成経路

でなく、近年の世界的な環境意識の高まりから、石油に依存する化学原料や有害な金属触媒の使用、さらには高温・高圧条件下で合成するプロセスは敬遠され、新たな供給ルートが模索されている。このほかに、オリーブオイル製造時に発生する排水からの精製も検討されているが、効率が低く、実用化には至っていない⁴⁾。

2015年、持続可能な社会を実現するための世界目標 (持続可能な開発目標、SDGs) が決定された。その達成に向け、経済活動と環境保全が両立した新しいプロセス開発が要請され、従来の化学工業的製法とは異なり、省エネルギー・低環境負荷で目的化合物を製造できるバイオテクノロジーは、その一端を担う重要な技術として注目されている。特に微生物や酵素のもつ優れた物質変換能を活用した有用物質生産は、今後、ますます重要な技術になると期待される。このような背景から、HTを生体触媒である酵素を用い合成する手法も報告されている⁵⁻⁷⁾。例えば、メラニン色素合成に関与するチロシナーゼの利用がある⁵⁾。本酵素は酸素を酸化剤としてタンパク質アミノ酸であるチロシン (Tyr) を水酸化し、ジヒドロキシフェニルアラニン (DOPA) を生成する (図2上段)。キノコ由来チロシナーゼはTyrと同じくフェノール構造をもつチロソールも水酸化できるため、HT合成に利用された (図2下段)。しかし、本酵素はジオキシゲナーゼであり、水酸化反応に加えてキノン体への過剰な酸化反応も触媒するため、アスコルビン



Development of production systems of a powerful antioxidant hydroxytyrosol

Yasuharu Satoh

Division of Engineering, Hokkaido University

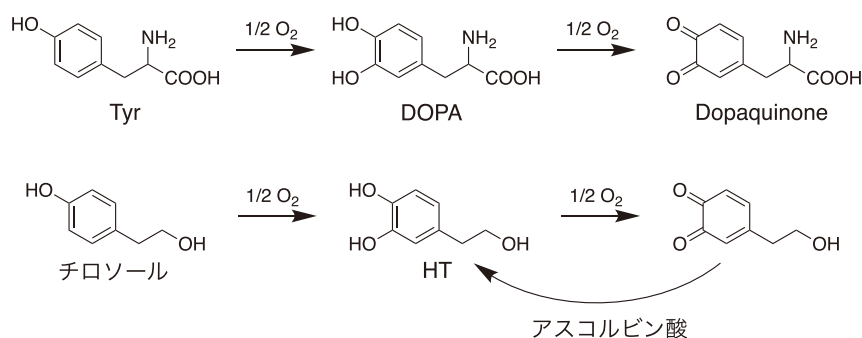


図2 チロシナーゼを利用した HT 合成
上段：Tyr 水酸化反応、下段：HT 合成反応

酸による還元プロセスが必要となる。このほかに、フラビン依存性ヒドロキシフェニル酢酸モノオキシゲナーゼやトルエンモノオキシゲナーゼを用いたチロソールのHTへの変換プロセスも報告されている^{6,7)}。これらの酵素合成法はいずれも化学合成された原料を用いるため、持続可能な開発目標SDGsの達成の観点から改善が求められる。

そこで我々は、再生可能で安定供給が可能なバイオマスを原料に、常温・常圧下で物質生産が可能な微生物による発酵生産法の開発に着手した。これまでにHT高生産菌の報告はなかったため、HT生合成経路を実装した遺伝子組換え大腸菌による発酵生産について検討した。大腸菌はゲノム情報や遺伝子機能に関する知見などが充実し、さらにプラスミドベクターや遺伝子ライブラリーなどの遺伝子工学ツールが豊富、遺伝子導入や破壊が容易など、ほかの宿主微生物よりも非常に扱いやすいという利点があり、物質生産に広く用いられている。まずは、導入するHT生合成経路を検討した。オリーブから得られるHTは、オレウロ

ペインの加水分解によって生成される(図1)。オレウロペインはチロソールを部分構造にもつリグストロシドの水酸化によって生合成されると予想されているが²⁾、関与する酵素は同定されておらず、新たな経路をデザインすることとした。

我々はTyrを原料に脱炭酸とそれに続くアミノ基の酸化、生成したアルデヒド基の還元反応を経てチロソールへ変換する植物および微生物由来酵素を用いた人工的な代謝経路を設計し、合成生物学のアプローチで大腸菌へ実装することに成功していた⁸⁾(図3)。この成果に基づき、Tyrに代えてDOPAを出発化合物とすることでHTが合成可能になると考え、検証した⁹⁾(図3)。チロソール合成で採用した植物由来Tyr脱炭酸酵素(TDC)はDOPAの脱炭酸反応も触媒するためHT合成に利用できる。しかし、Tyrが存在する大腸菌内ではチロソールが副生される。後述のように、TyrはDOPA合成の基質でもありHT収率の低下を招く。酵素は多種多様な化合物が混在する生体内で特定の

Biomass (glucose, glycerol, etc)

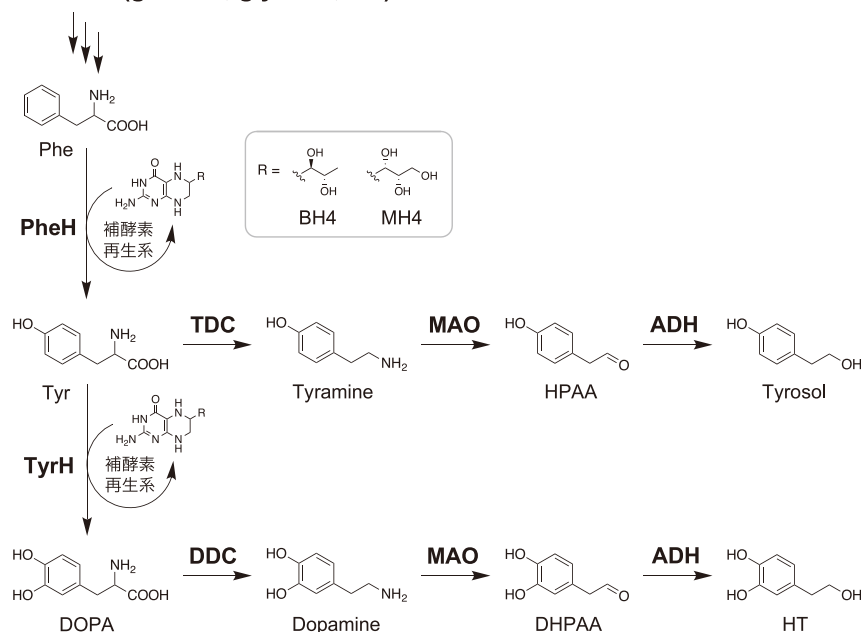


図3 構築した HT およびチロソール生合成経路
BH4：テトラヒドロbiopterin、MH4：テトラヒドロmonapterin、HPAA：ヒドロキシフェニルアセトアルデヒド、DOPA：ジヒドロキシフェニルアラニン、DHPAA：ジヒドロキシフェニルアセトアルデヒド、HT：ヒドロキシチロソール、PheH：Phe水酸化酵素、TyrH：Tyr水酸化酵素、TDC：Tyr脱炭酸酵素、MAO：モノアミン酸化酵素、ADH：アルコール脱水素酵素、DDC：DOPA特異的脱炭酸酵素

化合物と反応する高い基質特異性をもつため、動物由来のDOPA特異的脱炭酸酵素(DDC)を用いることで、HT選択的合成を達成した。

続いて、大腸菌でのDOPA合成を検討した⁹⁾。DOPA合成活性をもつ酵素として前述のチロシナーゼがあるが、DOPAは中間体であり、さらに酸化されたドパキノン還元する必要がある(図2)。このほかに、動物が神経伝達物質ドパミンやアドレナリンの生合成に用いるTyr水酸化酵素(TyrH)も知られていた。しかし本酵素は動物に特異的な補酵素であるテトラヒドロbiopterin(BH4)を要求するため、微生物による物質生産には利用されていなかった。このような背景下、我々はマウス由来酵素を大腸菌で異種宿主発現させ種々検討したところ、大腸菌に内在するテトラヒドロモナプテリン(MH4)が補酵素として機能することを明らかにした。MH4やBH4は反応の進行により酸化され消費される。ヒトはBH4再生系をもち、生体内でのTyr水酸化反応の進行には、その両方が必須である。そこでBH4再生関連酵素も大腸菌で共発現させた結果、DOPA合成反応が効果的に進行することがわかった。最終的に、全ての遺伝子を導入した大腸菌でグルコースを原料にHTの発酵生産に成功した(図3)。これは安価で再生可能な糖(グルコースなど)を原料に、有害な化合物を使用せず、常温・常圧下で製造する持続可能なプロセスである。しかし、現状の生産性は12 mg/L (0.08 mM)と非常に低い。そこで本研究では、HT生産性を改善し、実用生産の可能性を検証した。

2. 方 法

2.1. プラスミド構築

ラット由来PheH遺伝子、ヒト由来PCDおよびDHPR遺伝子は、大腸菌のコドンに最適化した配列で遺伝子合成し取得した。細菌由来PheH遺伝子は、当研究室の保存株より調製したゲノムDNAを鋳型としたPCRで増幅した。得られたDNAは該当の発現プラスミドへそれぞれクローニングし、各試験に使用した。

2.2. 生産試験

生産試験には、M9Y培地(0.1% [w/v] 酵母エキスを含むM9最少培地。炭素源としてグルコースまたはグリセロールを1.0% (w/v) 含む。)に5g/L Pheおよび20mg/L FeSO₄を添加した培地を使用した。この試験培地3mLに一晩培養した組換え大腸菌培養液をOD(濁度)が0.15となるように植菌し、30℃、200rpmで培養した。タンパク質発現を誘導するため、培養開始から3時間経過後にイソプロピル-β-チオガラクトピラノシドを最終濃度が0.5mMとなるように添加した。各時間に培養液をサンプリングし、菌体濃度はOD測定、生産物はHPLC解析した。

サンプル数はN=3とし、データは平均値 ± 標準偏差で記載した。

HPLC解析は、GLサイエンス社製InertSustain C18カラム(15cm × 2.1mm ID, 3μm)を連結した島津製作所社製HPLCシステムで行った。各培養液は1 N塩酸水溶液で5倍に希釈し、2μLをインジェクションした。化合物は下記の条件で分離し、210nmの吸収に基づき定量した。移動相A: 0.1% (v/v) ギ酸水溶液、移動相B: 0.1% (v/v) ギ酸含有メタノール、流速: 0.2mL/min、カラム温度: 35℃、グラジエント条件: 5%, 0-2min、5-30%、2-22min。

3. 結果と考察

3.1. HT生産における律速反応の解明とTyr供給の強化

グルコース(1.0% [w/v])からのHT生産量は12mg/L (0.08mM)と低く、またTyrを181mg/L (1mM)添加した培地を用いた場合でも29mg/L (0.19mM)と低かった⁹⁾。後者においてTyrの残存が確認されたことから、TyrからDOPAへの変換率の低さが原因と考えられた。本反応はTyrHが担うが、大腸菌内で反応を進行させるには補酵素MH4の供給も欠かせず、TyrHと補酵素再生系の両方の活性を評価する必要がある。

微生物の培養試験では、雑菌の混入を避けるため、試験培地を蒸気滅菌や濾過滅菌し使用する。しかし、Tyrの水への溶解度は453mg/L (2.5mM)と低いため、高濃度Tyr添加培地の調製に濾過滅菌は不適である。蒸気滅菌は、処理中にTyrがほかの培地成分と予期せぬ反応を引き起こすため適用できない。ヒトにとってPheは必須アミノ酸であるが、Tyrは非必須アミノ酸である。これはヒトがPhe水酸化酵素(PheH)をもち、PheからTyrを合成できるからである。本反応を担うPheHもTyrHと同じプテリン依存性芳香族アミノ酸水酸化酵素の一種である。Pheの水への溶解度は26,900mg/L (163mM)とTyrのそれと比較して非常に高い。そこで、本酵素を用いたPheからTyr変換経路を構築することで、高濃度でのTyr供給が可能になるだけでなく、MH4再生系の効率評価も可能になると考え検証した。

MH4再生には、ヒト由来プテリン-4α-カルビノールアミン脱水素酵素(PCD)とジヒドロプテリジン還元酵素(DHPR)を用いた。本遺伝子はPCD-DHPRの順のオペロンとなるように、中コピーベクターであるpSTV28のlacプロモーター下流にクローニングした(pSTV-BH4R、図4)。構築したプラスミドで大腸菌を形質転換し、タンパク質発現をSDS-PAGE解析したが、明白なバンドは確認できなかった(図5A)。そこで、各酵素に対する抗体を用いWestern blot解析した結果、図5BおよびCに示すように、可溶性画分に両タンパク質の発現が確認できた。

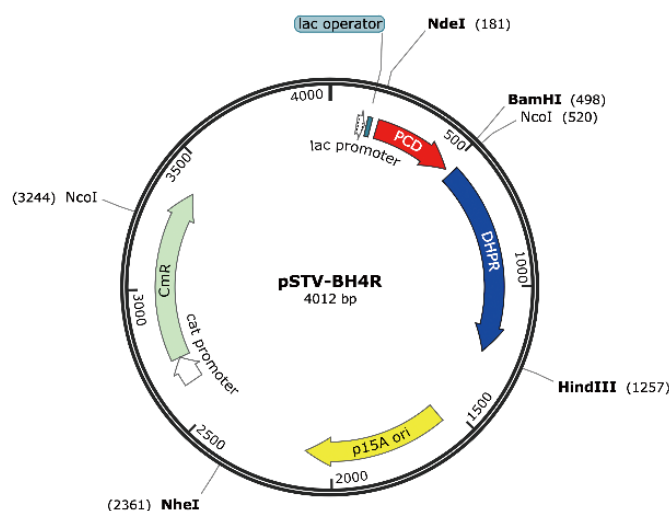


図4 プラスミド pSTV-BH4R のマップ

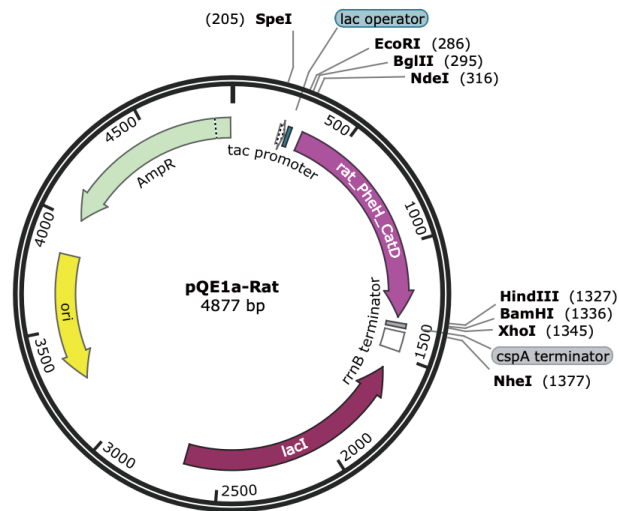


図6 プラスミド pQE1a-Rat のマップ

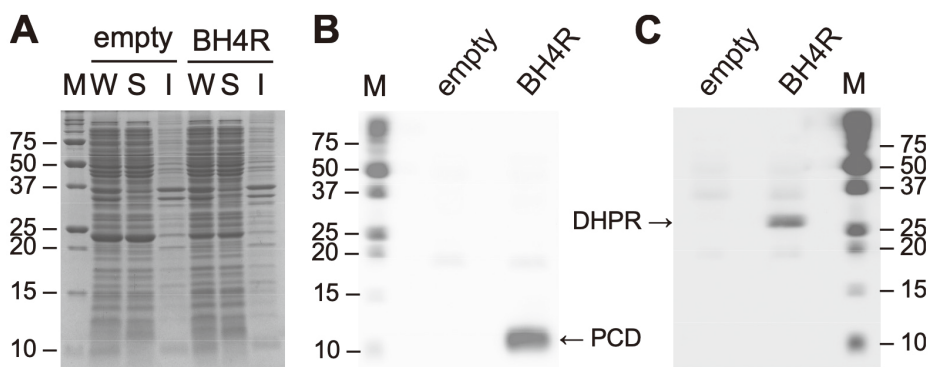


図5 大腸菌でのPCDおよびDHPR発現の検証

A: SDS-PAGE 解析、B: 抗 PCD 抗体を用いた Western blot 解析、C: 抗 DHPR 抗体を用いた Western blot 解析、empty:pSTV28 (コントロール)、BH4R:pSTV-BH4R、M: 分子量マーカー、W: 菌体破砕物、S: W の可溶性画分、I: W の不溶性画分
Western blot 解析では、活性な酵素が存在する可溶性画分を分析。

次に、PheH との共発現を検討した。PheH は大腸菌での発現が確認されているラット由来酵素の触媒ドメイン領域を高コピーベクター pQE1a の強力な tac プロモーター下にクローニングした (図6)。この際、宿主自身が産生した Tyr の混入を避けるため、Tyr 合成に必須な TyrA 遺伝子を破壊した大腸菌 (Y0 株) を用いた。その結果、Phe (分子量 165.19) を 5,000mg/L (30.3mM) 添加した培地を用い試験した結果、培養 48 時間で 79.7 ± 5.4 mg/L (0.44 ± 0.03 mM) の Tyr (分子量 181.19) 生産が確認されたが、変換率は 1.6 % と低かった。DHPR は MH4 再生時に補酵素 NAD(P)H を用いる。その供給には炭素源としてグルコースよりもグリセロールの方が適していることが知られており、グルコースに代えてグリセロールを用い評価した。その結果、Tyr 生産量は約 2.5 倍 (197 ± 34 mg/L, 1.09 ± 0.19 mM) に向上した。SDS-PAGE 解析で PheH の発現が確認できたにも関わらず、変換率は 3.6 % と依然として低かったため、ほかの酵素の利用を検討した。

一部の微生物も PheH をもつ¹⁰⁾。そこで、7 種の細菌から PheH 遺伝子を取得し、上記と同様の手法で評価した。その結果、当研究室で単離した *Gulbenkiania* 属細菌由来 PheH (GsPheH、図7) を発現した株で最も高い変換能が確認され、培養 72 時間で $5,236 \pm 598$ mg/L (28.9 ± 3.3 mM、図8) に達した。したがって、以降の検討には GsPheH を用いた。

2つのプラスミドの使用は、2種の抗生物質への耐性獲得やプラスミド DNA 合成による負担 (代謝負荷) の増加により、変換能が低下することが知られている。その影響を軽減するため、プラスミド pSTV-BH4R (図4) 中の lac プロモーターと補酵素再生関連遺伝子 (PCD と DHPR) を含む領域を PCR で増幅し、プラスミド pQE1a-Gs の NheI サイトに挿入した (pQE1a-Gs-BH4R、図9)。本プラスミドで形質転換した Y0 株の Tyr 生産量は、培養 72 時間で $5,852 \pm 471$ mg/L (32.3 ± 2.6 mM) に達した (図10)。この Tyr 生産量は添加した Phe を超過しているが、大腸菌

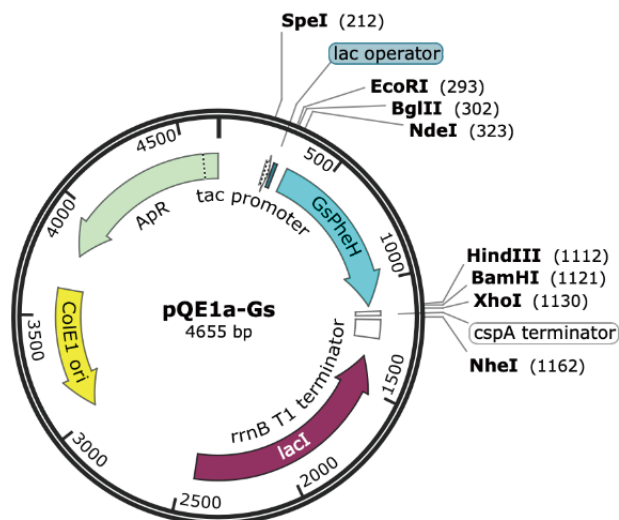


図7 GsPheH 発現プラスミド pQE1a-Gs のマップ

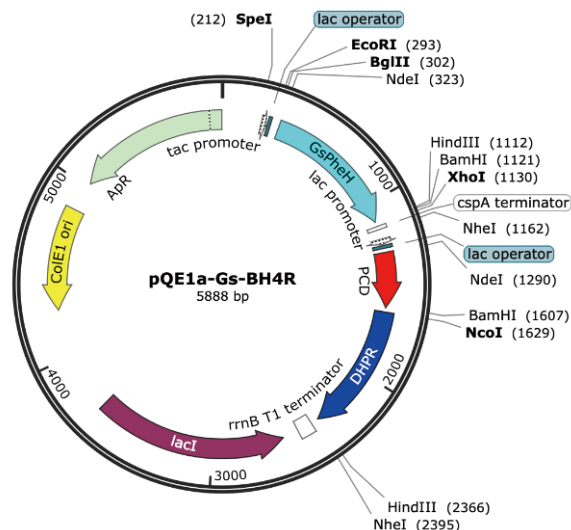


図9 プラスミド pQE1a-Gs-BH4R のマップ

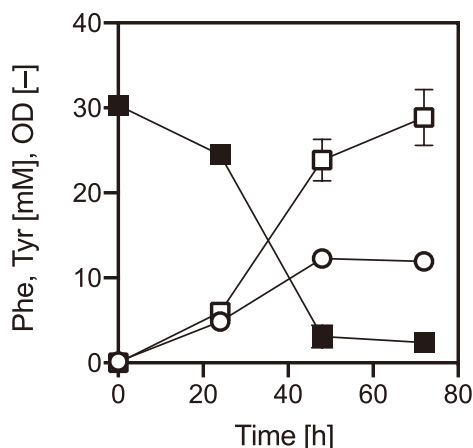


図8 pQE1a-Gs と pSTV-BH4R を導入した Y0 株の Tyr 生産試験
■ : Phe、□ : Tyr、○ : OD

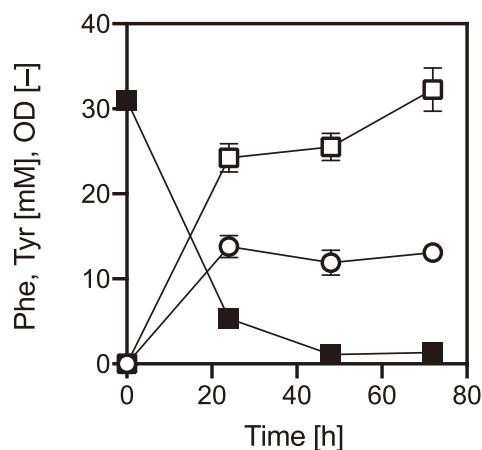


図10 pQE1a-Gs-BH4R を導入した Y0 株の Tyr 生産試験
■ : Phe、□ : Tyr、○ : OD

自身が産生した Phe が変換されたことが原因と考えられた。また、先の 2 つのプラスミドを導入した株 (図 8) と比較して、培養 24 時間時点の Tyr 生産量が大きく増加していた。これはプラスミド数削減によって代謝負荷が軽減し、生産速度が向上したためと考えられた。さらに、Tyr 高生産が確認されたことから、補酵素再生系も効率的に機能することが分かった。

プラスミド pQE1a-Gs-BH4R は、以前の HT 生産研究で構築した TyrH 発現プラスミド pBbE1k-3⁹⁾ (図 11) と同種の複製開始点 (ori) をもつため、大腸菌内で同時に保持させることができない。また HT 生産には、さらに DDC とモノアミン酸化酵素 (MAO) 遺伝子の導入が必須であり、多数のプラスミドの使用による宿主への代謝負荷の増大が懸念された。そこで、Tyr 生産に関与する PheH と補酵素再生遺伝子は、大腸菌ゲノムへ組込むこととした。プラスミド pQE1a-Gs-BH4R から PheH、PCD と DHPR 遺伝子を含む領域 (Tyr 生産遺伝子カセット) を PCR で増幅し、Tyr

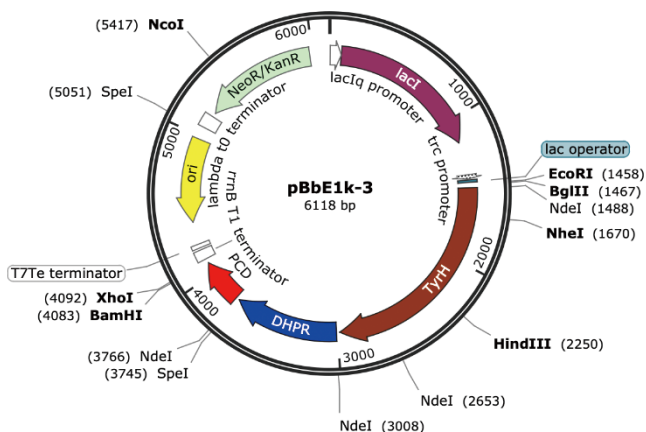


図11 プラスミド pBbE1k-3 のマップ

要求性大腸菌 (Y0 株) の TyrA 遺伝子破壊領域へ導入した (Gs1 株)。その培養 48 時間の Tyr 生産量を評価したところ、 $45.3 \pm 1.8 \text{ mg/L}$ ($0.25 \pm 0.01 \text{ mM}$) と非常に低かった

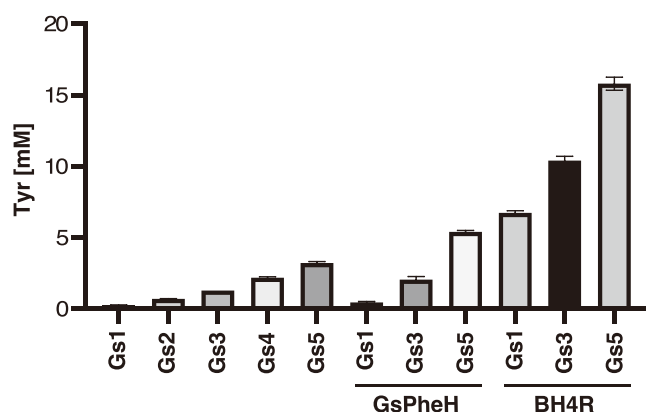


図 12 Tyr 生産遺伝子カセット組み込み株とそれらに pQE1a-Gs または pSTV-BH4R を導入した株の Tyr 生産試験
Gs1 ~ Gs5: Tyr 生産遺伝子カセットを 1 ~ 5 個組み込んだ株

(図 12)。ゲノム組み込みでは、大腸菌内で遺伝子は 1 コピーであるのに対し、プラスミド pQE1a-Gs-BH4R は約 30 コピーになる。Tyr 生産量の低下は、遺伝子コピー数の減少が影響していると考えられたため、Tyr 生産遺伝子カセットを大腸菌ゲノムの FeaB 遺伝子座へ追加で組み込んだ (Gs2 株)。その結果、Tyr 生産量は約 2.8 倍に向上したが、依然として低かった (図 12)。そこで、大腸菌ゲノムに組み込む遺伝子カセット数を 3、4、5 個とさらに増加させた株 (Gs3、Gs4 および Gs5 株) を構築し評価した結果、遺伝子カセット数に比例した Tyr 生産量の増加が確認された (図 12)。しかし、プラスミド発現時 (図 10) よりも大きく減少した。Phe の Tyr への変換反応は、Phe 水酸化と補酵素再生という 2 種の反応が必要なため、どちらかが律速反応になっていると予想した。この検証のため、Tyr 生産遺伝子カセットをゲノムに組み込んだ株に、先に構築した GsPheH 発現プラスミド pQE1a-Gs (図 7) または補酵素再生遺伝子発現プラスミド pSTV-BH4R (図 4) をそれぞれ導入し検証した (図 12)。その結果、GsPheH 遺伝子の導入では Tyr 生産量は $978 \pm 18 \text{ mg/L}$ ($5.4 \pm 0.10 \text{ mM}$) であったのに対し、BH4 再生遺伝子導入では $2,862 \pm 83 \text{ mg/L}$ ($15.8 \pm 0.46 \text{ mM}$) へと大きく向上した。よって、補酵素再生系が律速反応と判明した。このように Tyr 生産遺伝子カセット 5 個をゲノムに組み込んだ Gs5 株は、補酵素再生遺伝子の導入により物質生産において十分な Tyr 供給が可能であったことから、以降の検討に用いた。

3.2. HT 生産の検証

高い Tyr 供給が可能になったため、次の反応ステップである DOPA 変換について検証した。上述のように補酵素再生系の律速を回避するためには、その遺伝子の発現強化が必要であったため、以前の研究で構築したマウス由来 TyrH 遺伝子と BH4 再生関連遺伝子をオペロンとして発

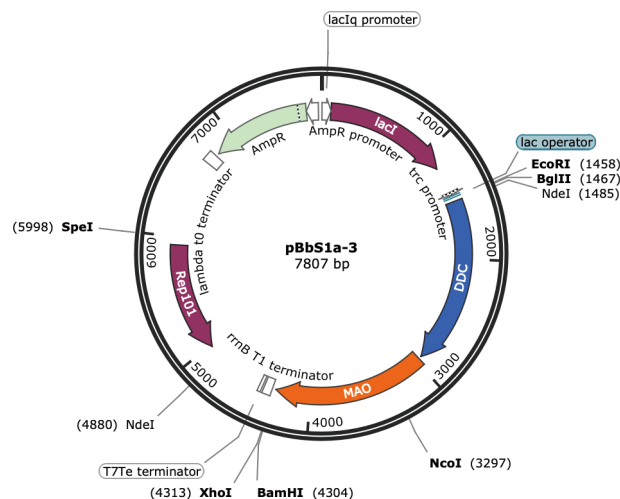


図 13 プラスミド pBbS1a-3 のマップ

現するプラスミド pBbE1k-3⁹⁾ (図 11) を用いた。その結果、期待通り DOPA 生産 ($1,033 \pm 12 \text{ mg/L}$; $5.2 \pm 0.06 \text{ mM}$) が確認された。

グラムオーダーでの DOPA 供給が可能であったため、HT 生産を試みた。以前、我々が HT 生産時に使用したブタ由来 DDC 遺伝子と *Micrococcus luteus* 由来 MAO 遺伝子をオペロンとして発現するプラスミド pBbS1a-3⁹⁾ (図 13) を上記の pBbE1k-3 を含む Gs5 株に導入し評価した。その結果、予想に反し、HT だけでなく DOPA も検出されず、約 30mM の Phe が未反応のまま残存していた。このように反応が全く進行しなかった原因として、3 章 1 節で確認された複数プラスミドの導入による宿主の代謝負荷の増大が考えられた。

4. 総括

強力な抗酸化活性をもつ HT の化粧品原料としての利用価値は非常に高い。近年は COVID-19 の感染予防効果も注目されており、高純度品を安価に安定供給するルートが模索されている。我々は、その 1 つとして組換え大腸菌による発酵生産法を提案した⁹⁾。本研究では、その生産性向上を目指し、まずは基質となる Tyr 供給の強化に取組み、成功した。そこで、Tyr 供給を強化した大腸菌へ以前の研究で構築した HT 生産用プラスミドを導入したが、HT 生産を達成できなかった。この原因として、複数プラスミドの導入による宿主の代謝負荷の増加が考えられた。今後は代謝負荷の軽減のため、HT 合成に必要な遺伝子全てを大腸菌ゲノムへ組み込む必要があると考えている。

謝辞

本研究の遂行にあたり、御援助を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) L. Martínez-Zamora, R. Peñalver, G. Ros, G. Nieto. Olive tree derivatives and hydroxytyrosol: their potential effects on human health and its use as functional ingredient in meat. *Foods* 10, 2611 (2021)
- 2) S. H. Omar. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci. Pharm.* 78, 133-154 (2010)
- 3) S. Paolacci, M. C. Ergoren, D. De Forni, E. Manara, B. Poddesu, G. Cugia, K. Dhuli, G. Camilleri, G. Tuncel, H. Kaya Suer, N. Sultanoglu, M. Sayan, M. Dundar, T. Beccari, M. R. Ceccarini, I. S. Gunsel, A. Dautaj, T. Sanlidag, S. T. Connelly, G. M. Tartaglia, M. Bertelli. In vitro and clinical studies on the efficacy of α -cyclodextrin and hydroxytyrosol against SARS-CoV-2 infection. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 25, 81-89 (2021)
- 4) N. Kalogerakis, M. Politi, S. Foteinis, E. Chatzisyneon, D. Mantzavinos. Recovery of antioxidants from olive mill wastewaters: a viable solution that promotes their overall sustainable management. *J. Environ. Manage.* 128, 749-758 (2013).
- 5) J. C. Espín, C. Soler-Rivas, E. Cantos, F. A. Tomás-Barberán, H. J. Wichers. Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst. *J. Agric. Food Chem.* 49, 1187-1193 (2001)
- 6) P. P. Liebgott, A. Amouric, A. Comte, J. L. Tholozan, J. Lorquin. Hydroxytyrosol from tyrosol using hydroxyphenylacetic acid-induced bacterial cultures and evidence of the role of 4-HPA 3-hydroxylase. *Res. Microbiol.* 160, 757-766 (2009)
- 7) M. Brouk, A. Fishman. Protein engineering of toluene monooxygenases for synthesis of hydroxytyrosol. *Food Chem.* 116, 114-121 (2009)
- 8) Y. Satoh, K. Tajima, M. Munekata, J. D. Keasling, T. S. Lee. Engineering of a tyrosol-producing pathway, utilizing simple sugar and the central metabolic tyrosine. *J. Agric. Food Chem.* 60, 979-984 (2012)
- 9) Y. Satoh, K. Tajima, M. Munekata, J. D. Keasling, T. S. Lee. Engineering of L-tyrosine oxidation in *Escherichia coli* and microbial production of hydroxytyrosol. *Metab. Eng.* 14, 603-610 (2012)
- 10) A. Pribat, I. K. Blaby, A. Lara-Nunez, J. F. Gregory III, V. de Crecy-Lagard, A. D. Hanson. FolX and FolM are essential for tetrahydromapterin synthesis in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 192, 475-482 (2010)