

Pseudonocardia autotrophica 유래의 신규 Cytochrome P450 Hydroxylase 유전자의 분리 및 염기서열 특성규명

명지선¹ · 박현주² · 한규범³ · 김상년⁴ · 김응수^{1*}

¹인하대학교 생물공학과, ²성원엔비켐(주), ³(주)핸슨바이오텍, ⁴(주)LG생활건강

본 논문에서는 희소 방선균, *Pseudonocardia autotrophica* (KCTC 9441) 유래 신규 Cytochrome P450 hydroxylase (CYP) 유전자들을 분리하여 염기서열 특성을 규명하였으며, 기존에 밝혀진 다른 방선균 유래 CYP 유전자들과의 연관성을 알아보았다. 이를 위하여 *P. autotrophica*의 cosmid DNA library를 제작하였고, 방선균에서 발견되는 CYP 유전자군의 보존된 서열로부터 제작된 degenerate primers를 이용한 PCR을 수행하여, *P. autotrophica* cosmid DNA library를 검색하였다. *P. autotrophica* cosmid DNA library 검색 결과, *P. autotrophica*에는 염기서열이 서로 다른 4종의 신규 CYP 유전자가 존재함이 확인되었으며 (CYP601-1, 601-2, 602, 605), 이들 신규 CYP 유전자들은 방선균 유래 2차대사산물의 생합성에 관여하는 CYP 유전자와 높은 유사성을 나타냈다. 특히, pESK601에서 확인된 CYP 유전자 및 주변 유전자의 염기서열을 검색한 결과, polyene 계열의 항진균제, amphotericin 과 nystatin의 생합성 유전자들과 매우 높은 유사성을 보임으로써, *P. autotrophica*에는 신규 polyene 계열의 항진균제 화합물의 생합성 유전자 군이 존재함도 규명되었다.

Key words □ cytochrome P450 hydroxylase, polyene, *Pseudonocardia autotrophica*

Cytochrome P450 hydroxylase (CYP)는 모든 진핵생물, 동물, 식물, 곤팡이, 그리고 미생물 내에 존재하는 효소로서, 일반적으로 다양한 대사산물이나 외래 xenobiotics의 초기 산화과정에 관여하는 매우 중요한 효소이다. 특히 이미 보고 된 박테리아계의 CYP 중에서 약 40%가 산업적으로 유용한 토양 미생물인 *Streptomyces* 속의 45종에서 발견되었다(10). 이러한 *Streptomyces* 속의 CYP들은 세포내에 용해된 상태로 존재하고, 기초 대사에는 관여하지 않지만 steroids, fatty acids, pheromones, leukotrienes 등과 같은 natural compounds의 산화, 과산화, 환원반응에 특이적으로 관여하는 것으로 알려져 있다(11).

CYP는 다양한 화학구조의 기질을 산화시켜 물질의 구조 및 위치 특이적 활성을 유도한다(6). 예를 들면, *Saccharopolyspora erythraea*에서 CYP107A1 (EryF)은 erythromycin 생합성 과정 중 6-deoxyerythronolide B를 erythronolide B로 hydroxylation시킨다(16). *Streptomyces venezuelae*의 CYP107L1 (PikC)는 YC-17과 narbomycin를 hydroxylation시키고(17), *Streptomyces fradiae*의 CYP113B1과 CYP105L1은 Tylosin 생합성 과정 중에 작용한다(8). Amphotericin을 합성하는 *Streptomyces nodosus*내에는 CYP161A3 (AmphL), CYP105H4 (AmpN)^o(1), nystatin을 합성하는 *Streptomyces noursei*내에는 CYP161A1 (NysL), CYP105H1 (NysN)^o(15), rapamycin을 합성하는 *Streptomyces hygroscopicus*내에는 CYP122A2 (RapJ), CYP107G1 (RapN)가 각각 포함되어 있다(9). 또한

doxorubicin을 생합성하는 *Streptomyces peucetius*내에는 CYP 129A2, CYP131A1^o(7, 12), nikomycin을 합성하는 *Streptomyces tendae*와 *Streptomyces ansochromogenes*에는 각각 CYP162A1 (NikQ), CYP105K2 (SanL), SanQ가 포함되어 있다(2, 18). 이와 같이 여러 종류의 방선균 유래 항생제, 항암제, 항진균제의 생합성 과정에는 모두 특이적인 CYP가 포함되어 있는데, 이러한 특성의 신규 CYP의 확보는 새로운 유용생리활성물질을 합성 및 변형을 유도할 수 있는 유용한 유전자원으로 간주되고 있다.

따라서 본 연구에서는 vitamin D3 hydroxylase의 기능(5, 14)을 갖는 희소 방선균 *Pseudonocardia autotrophica* 내에 존재하는 신규 CYP 유전자군을 클로닝하고, 그 염기서열의 특성을 규명함으로써, 새로운 유용생리활성물질 창출에 적용할 수 있는 유용 CYP 유전자군을 확보하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배양방법

본 실험에서 사용된 균주는 *P. autotrophica* KCTC9441로서 R2YE 액체배지에서 균사체 상태로 성장시킨 후 20% glycerol stock으로 -20°C에 냉동 보관하여 사용하였다(3).

*P. autotrophica*의 genomic DNA 분리에 사용될 균체를 얻기 위하여 YEME (sucrose 340g, yeast extract 3g, Bacto-peptone 5 g, malt extract 3g, glucose 10g, D.W. 1L) 액체 배지에 stock을 충분히 접종하였다. 28°C에서 5일간 배양한 후, 원심분리기 (8,000 rpm)를 이용하여 균체를 수확하였다(3).

*To whom correspondence should be addressed.

Tel: 032-860-8318, Fax: 032-872-4046

E-mail: eungsoo@inha.ac.kr

Cosmid DNA library 제작과 클로닝에 사용된 *E. coli* DH5 α 는 LB 배지(0.5% yeast extract, 1% tryptone peptone, 0.5% NaCl, 0.1% glucose)에서 성장시켰고, 필요에 따라 항생제인 apramycin (Sigma, USA) 50 μ g/ml 또는 ampicillin (Sigma, USA) 100 μ g/ml가 첨가된 LB 배지에서 배양하였다(13).

Cosmid DNA library 제작

Cosmid DNA library는 *Streptomyces-E. coli* shuttle cosmid vector인 pOJ446을 이용하여 제작되었다(3). YEME에서 배양된 *P. autotrophica*부터 total chromosomal DNA를 순수하게 분리하여, EcoRV로 처리한 후 40kb이상의 DNA 절편을 pOJ446에 클로닝 하였으며(3), 제작된 재조합 콜로니는 10⁴ 이상의 titer가 확인되었다.

Cosmid DNA library 검색을 위한 degenerate PCR primer 제작

*Rhodococcus fascians*의 cytochrome P450 FAS1 (P46373), *Amycolatopsis mediterranei*의 cytochrome P450 monooxygenase (AF040570), *Streptomyces coelicolor* A3(2)의 putative cytochrome P450 (NP625076), *Streptomyces ansochromogenes*의 cytochrome P450 (AF469953), *Streptoalloteichus hindustanus*의 cytochrome P450 hydroxylase (AF071147)와 같은 방선균 유래의 cytochrome P450 hydroxylase들은 상당히 유사한 아미노산 서열을 가지고 있으며, 특히 oxygen-binding site와 heme liganding pocket에서의 유사성은 매우 높다. 따라서 이 두 conserved region에서의 아미노산 서열의 유사성을 이용하여 degenerate PCR primer (forward Deg-1 : 5'-TXCTXCTXATCGCXGGXCACGAGAC-3', reverse Deg-2 : 5'-GCXAGGTTCTGXCCXAGGCACTGGTG-3'; X=G or C)를 제작하였다 (COSMO Co., Korea) (4) (Fig. 1).

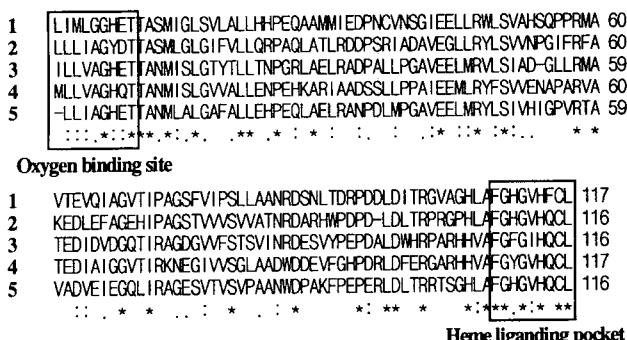


Fig. 1. Amino acid sequence alignment of the central portion of Actinomycete cytochrome P450 hydroxylase. 1: Cytochrome P450 FAS1, P46373, [Rhodococcus fascians]. 2: Cytochrome P450 monooxygenase, AF040570, [Amycolatopsis mediterranei]. 3: Putative cytochrome P450, NP625076, [Streptomyces coelicolor A3(2)]. 4: Cytochrome P450, AF469953, [Streptomyces ansochromogenes]. 5: Cytochrome P450 hydroxylase, AF071147, [Streptoalloteichus hindustanus]. Boxes indicate the selected sequences for the generation of degenerate oligonucleotide primers.

PCR에 의한 P450 hydroxylase 유전자의 증폭

*P. autotrophica*의 total chromosomal DNA와 cosmid DNA library를 template로 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 수행을 위한 반응물 조성은 20 μ M의 primer, 100 mM Tris-HCL [pH 8.3], 20 mM MgCl₂가 포함된 10× PCR buffer (Takara, Japan), 1U Taq polymerase (Takara), 10% dimethyl sulfoxide로 구성하였다. PCR 반응은 denaturing (96°C, 30초), annealing (40°C, 30초), extention (72°C, 35초) 조건으로 30 cycle 동안 수행하였다.

Cosmid DNA library의 검색

Microplate reader로서 미생물생장 과정 중의 O.D. (optical density) 값의 변화를 측정하여 미생물의 생장상태를 분석하는 Bioscreen C (Transgalactic Ltd., Finland)를 이용하여 재조합 콜론들을 배양한 후, 재조합 cosmid DNA를 분리하여 template로 사용하고 앞서 제작된 CYP degenerate primer와 PCR 반응 (denaturing [96°C, 30초], annealing [40°C, 30초], extention [72°C, 35초], 30 cycle)을 수행하였다. 이와 같은 PCR-based method로 약 1600여개의 재조합 콜로니들을 검색하였다.

PCR 산물의 분석

PCR 수행 결과 증폭된 DNA 단편은 pGEM T-easy vector (Promega, USA)에 클로닝하여 *E. coli* DH5 α 에 형질 전환시켰다. 형질 전환된 콜로니는 100 μ g/ml ampicillin이 첨가된 LB 배지에서 배양하여 균체를 회수하고, alkaline 용해와 sodium acetate 침전을 통하여 재조합 plasmid를 추출하였다. 염기서열 분석을 수행하였고, NCBI (The National Center for Biotechnology Information)의 BlastX (Basic Local Alignment Search Tool X)에서 상동성을 조사하였다.

선별된 cosmid내의 P450 hydroxylase 유전자 염기서열 확인

선별된 cosmid내의 P450 hydroxylase 유전자 위치를 예측하고 이를 클로닝을 하기 위해 각각의 cosmid DNA를 BamHI (Promega, USA)와 PstI (Promega, USA)으로 처리하여 template로 사용하여 Southern hybridization을 수행하였다(13). 각각의 cosmid로부터 증폭된 약 350bp PCR 산물을 DIG-labeling해서 probe로 사용하였고, positive control로는 probe를 사용하였다. 각각 선별된 cosmid 단편을 클로닝하여 염기서열 분석을 하였고, 분석된 염기서열을 비교하여 primer를 합성하고 염기서열을 분석하는 반응을 반복하였다. 이때 염기서열의 상동성은 NCBI의 BlsatX로 조사하였다.

결과 및 고찰

CYP degenerate PCR에 의한 *P. autotrophica*의 cosmid DNA library 검색

*P. autotrophica*로부터 추출한 genomic DNA를 template로 하여 CYP degenerate primer로 PCR을 수행한 결과, 약 350bp의

DNA 단편이 증폭되었다. 증폭된 DNA의 염기서열을 분석한 결과, *Actinomycetes* 유래 *CYP*와 매우 높은 유사성이 확인되었다(자료미제시). 하지만 기존에 규명된 *actinomycetes* 유래 *CYP*와의 아미노산 서열을 비교하면 그 어떤 유전자와도 100% 동일하지 않음이 밝혀졌다. 따라서 *P. autotrophica*내에는 신규 *CYP* 유전자가 존재하고 있음을 예측할 수 있었고, *P. autotrophica*의 total chromosomal DNA를 template로 cosmid DNA library를 제작하여 *CYP* degenerate primer와의 PCR 반응을 이용하여 신규 *CYP* 유전자를 검색하였다.

이미 제작된 *CYP* degenerate primer를 이용한 PCR-based 검색방법을 통해 약 1600여개의 재조합 콜로니들을 검색하였고, 그 중 *CYP* 유전자의 중심부분으로 예상되는 350bp 크기의 DNA 단편이 증폭된 5개의 재조합 cosmid를 확보하였다. 이들 cosmid는 각각 pESK601, pESK602, pESK603, pESK604, pESK605이라 명명 하였다. PCR반응에 의해 증폭된 DNA 단편들의 염기서열을 분석한 결과, *Actinomycetes* 유래 *CYP*들과 높은 유사성을 보였다. 각각의 염기서열은 pESK601과 pESK603이 동일하였고, pESK602와 pESK604가 동일하였으며, pESK605는 다른 재조합 cosmid들로부터 증폭된 염기서열과는 다르게 나타났다. 따라서 *P. autotrophica* 균주에는 적어도 서로 다른 3개의 신규 방선균 *CYP* 유전자가 존재함이 확인되었다.

*P. autotrophica*로부터 CYP 유전자의 분리 및 염기서열 분석

PCR-based 검색방법을 통해 선별된 cosmid들로부터 CYP degenerate primer에 의해 증폭된 약 350bp의 PCR 산물을 DIG-labeling해서 probe로 사용하고, 각각 *Bam*H I와 *Pst*I으로 처리된 cosmid DNA를 template로 이용하여 Southern hybridization을 수행하였다. 이 때 신호가 보이는 단편을 제한효소로 처리된 pWHM3 (*Streptomyces-E. coli* shuttle vector)에 클로닝하여 염기서열을 분석하였고, CYP 유전자가 절단되어 클로닝이 된 경우에는 cosmid를 template로 primer를 제작하여 염기서열을 분석하였다.

신규 *CYP* 유전자의 염기서열을 NCBI의 BlsatX로 분석한 결과, 각각의 cosmid에서 pESK601은 2개, pESK602, pESK605은 각각 1개의 신규 *CYP* 유전자가 확인되었다(Fig. 2, 3). pESK601내의 CYP601-1은 start codon이 ATG이고 413개의 아미노산으로 이루어져 있으며 G+C content는 72.8%이고 (FramePlot-2.3), *Streptomyces noursei*의 NysN과 74%의 identity를 나타내었다. pESK601내에서 CYP601-1유전자의 downstream을 primer walking에 의해 염기서열을 분석한 결과, 또 다른 *CYP*가 존재하는 것이 확인되었고 이 유전자를 CYP601-2라고 명명하였다. CYP601-2의 염기서열에서는 기존의 *CYP* conserved region과는 상이한 염기서열이 존재하고 있었기 때문에 *CYP* degenerate primer로는 종 폭이 되지 않았으리라 추정된다. CYP601-2의 start codon은 ATG이고 403개의 아미노산으로 이루어져 있으며, G+C content는 72.5%이고 (FramePlot-2.3), *Streptomyces noursei*의 NysL과 68%의 identity를 나타내었다. pESK602의 CYP602는 start codon

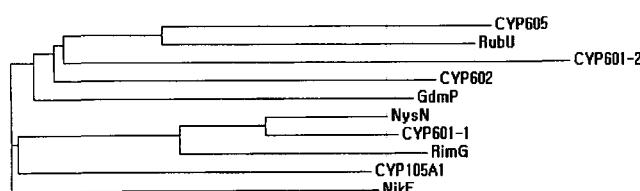
Fig. 2. Nucleotide sequences of novel CYPs from *P. autotrophica*. (A) CYP601-1. (B) CYP601-2. (C) CYP602. (D) CYP605.

이 ATG이고 404개의 아미노산으로 이루어져 있으며 G+C content가 73.7%이고(FramePlot-2.3), *Rhodococcus fascians*의 FAS1과 43%의 identity를 나타내었다. 마지막으로 pESK605의 CYP605는 start codon이 ATG이고 403개의 아미노산으로 이루-

Fig. 3. Alignment of the deduced

Table 1. Putative CYPs in *P. autotrophica* with their closest homologues

CYP name	Size ^a	Species	Match in the database ^b	
			Proteins	Identities (%)
CYP601-1	413	<i>Streptomyces noursei</i>	NysN	74
		<i>Streptomyces nodosus</i>	AmphN	75
CYP601-2	403	<i>Streptomyces noursei</i>	NysL	68
		<i>Streptomyces nodosus</i>	AmphL	64
CYP602	404	<i>Rhodococcus fascians</i>	FAS1	43
		<i>Kineococcus radiotolerans</i>	Cytochrome P450	39
CYP605	403	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	CYP107B1	51
		<i>Streptomyces collinus</i>	RubU	51

^aNumber of amino acids.^bBlastX database search at NCBI.**Fig. 4.** Phylogenetic tree of CYPs from *P. autotrophica* and other *Actinomycetes*. The sources of the amino acid sequences are as follow: NysN [*Streptomyces noursei*], RubU [*Streptomyces collinus*], GdmP [*Streptomyces hygroscopicus*], RimG [*Streptomyces diastaticus*], CYP105A1 [*Streptomyces griseolus*], NikF [*Streptomyces tendae*].

어져 있으며 G+C content는 72.4%이고 (FramePlot-2.3), *Saccharopolyspora erythraea*의 CYP107B1와 51%의 identity를 나타내었다 (Table 1, Fig. 4).

특히 pESK601의 CYP601-1과 CYP601-2의 경우, 항진균 활성을 나타내는 polyene macrolide antibiotics의 생합성 과정에 관여하는 CYP와 매우 높은 유사성을 보였다. 따라서 CYP601 유전자 주변에 polyene 생합성에 관여하는 추가적인 생합성 유전자가 존재하는지를 검증하기 위하여, pESK601을 BamHI 제한 효소로 처리하여 CYP601 유전자가 포함된 약 3kb 단편을 서브클로닝 하였다. 3kb의 DNA 단편의 염기서열을 분석한 결과, 3kb 단편에는 CYP 유전자 이외에 2개의 open reading frame (ORF) 이 추가적으로 존재하였고, NCBI의 BlastX로 상동성을 검색한 결과, 첫 번째 ORF는 nystatin glycosyltransferase 유전자 *nysDI*, amphotericin glycosyltransferase 유전자 *amphDI*와 각각 79%, 75%의 상동성을 보였으며, 두 번째 ORF는 nystatin aminotransferase 유전자 *nysDII*, amphotericin aminotransferase 유전자 *amphDII*와 각각 82%, 81%의 상동성을 보였다 (Myeong et al., unpublished data). 이러한 결과는 *P. autotrophica*의 염색체 내에 polyene macrolide 계열의 신규 항진균제 생합성 유전자 군이 존재함을 강하게 암시하고 있으며, 신규 유용 CYP 유전자 군의 확보를 통한 새로운 유용생리활성물질 창출 가능성을 제시하고 있다.

감사의 말

본 연구는 21C 프론티어연구사업 (미생물유전체 MG3-1과제, M102KK010012-04K1101-01211)의 지원에 의해 수행되었기에, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Caffrey P., S. Lynch, E. Flood, S. Finnane, and M. Oliynyk. 2001. Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes. *Chem. Biol.* 8, 713-723.
2. Chen, H., K.H. Brian, E.C. Sarah, and T.W. Christopher. 2002. Formation of β-hydroxy histidine in the biosynthesis of nikkomycin antibiotics. *Chem. Biol.* 9, 103-112.
3. Hopwood, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chater, T. Kieser, C.J. Bruton, H.M. Kieser, D.J. Lydiate, C.P. Smith, and H. Schrempp. 1985. Genetic Manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual. John Innes Foundation. Norwich.
4. Hyun, C.-G., J.-M. Kim, S.-K. Hong, and J.-W. Suh. 1998. An efficient approach for cloning P450 hydroxylase genes from actinomycetes. *J. microbiol. Biotechnol.* 8, 295-299.
5. Kim J.-M., Y. Jin, C.-G. Hyun, J.-H. Kim, H.-S. Lee, D.-K. Kang, D.-J. Kang, T.-Y. Kim, J.-W. Suh, S.-S. Kang, and S.-K. Hong. 2002. Molecular cloning and analysis of the gene for P-450 hydroxylase from *Pseudonocardia autotrophica* IFO 12743. *J. Microbiol.* 40, 211-218.
6. Lamb, D.C., H. Ikeda, D.R. Nelson, J. Ishikawa, T. Skaug, C. Jackson, S. Omura, M.R. Waterman, and S.L. Kelly. 2003. Cytochrome p450 complement (CYPome) of the avermectin-producer *Streptomyces avermitilis* and comparison to that of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307, 610-619.
7. Lomovskaya, N., S.L. Otten, Y.D. Katayama, L. Fonstein, X.C. Liu, T. Takatsu, A.I. Solari, S. Filippini, F. Torti, A.L. Colombo, and C.R. Hutchinson. 1999. Doxorubicin overproduction in *Streptomyces peucetius*: cloning and characterization of the *dnrU* ketoreductase and *dnrV* genes and the *doxA* cytochrome P-450 hydroxylase gene. *J. Bacteriol.* 181, 305-318.
8. Merson-Davies, L.A., and E. Cundliffe. 1994. Analysis of five tylosin biosynthetic genes from the *tyllBA* region of the *Strepto-*

- myces fradiae* genome. *Mol. Microbiol.* 13, 349-355.
9. Molnar, I., J.F. Aparicio, S.F. Haydock, L.E. Khaw, T. Schwecke, A. Konig, J. Staunton, and P.F. Leadlay. 1996. Organisation of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of genes flanking the polyketide synthase. *Gene* 169, 1-7.
 10. Nelson, D.R. 1999. Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch. Biochem. Biophys.* 369, 1-10.
 11. Omura, T. 1999. Forty years of cytochrome P450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266, 690-698.
 12. Otten, S.L., X. Liu, J. Ferguson, and C.R. Hutchinson. 1995. Cloning and characterization of the *Streptomyces peucetius dnrQS* genes encoding a daunosamine biosynthesis enzyme and a glycosyl transferase involved in daunorubicin biosynthesis. *J. Bacteriol.* 177, 6688-6692.
 13. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
 14. Sasaki, J., A. Miyazaki, M. Saito, T. Adachi, K. Mizoue, K. Hanada, and S. Omura. 1992. Transformation of vitamin D3 to 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 via 25-hydroxyvitamin D3 using *Amycolata* sp. strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 152-157.
 15. Trygve, B., O.N. Sekurova, H. Sletta, T.E. Ellingsen, A.R. Strøm, S. Valla and S.B. Zotchev. 2000. Biosynthesis of the polyene anti-fungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. *Chem. Biol.* 7, 395-403.
 16. Weber, J.M., J.O. Leung, S.J. Swanson, K.B. Idler, and J.B. McAlpine. 1991. An erythromycin derivative produced by targeted gene disruption in *Saccharopolyspora erythraea*. *Science* 252, 114-116.
 17. Xue, Y.D., Wilson, L. Zhao, H. Liu, and D.H. Sherman. 1998. Hydroxylation of macrolactones YC-17 and narbomycin is mediated by the *pikC*-encoded cytochrome P450 in *Streptomyces venezuelae*. *Chem. Biol.* 5, 661-667.
 18. Zeng, H., H. Tan, and J. Li. 2002. Cloning and function of *sanQ*: a gene involved in nikkomycin biosynthesis of *Streptomyces anschromogenes*. *Curr. Microbiol.* 45, 175-179.

(Received August 12, 2004/Accepted September 10, 2004)

ABSTRACT : Cloning and Characterization of Novel Cytochrome P450 Hydroxylase Genes from *Pseudonocardia autotrophica*

Ji Seon Myeong¹, Hyun-Joo Park², Kyuboem Han³, Sang-Nyun Kim⁴, and Eung-Soo Kim^{1*} (¹Department of Biotechnology, Inha University, Incheon 402-751, Korea, ²SongWon Envichem, Co., Seoul 135-010, Korea, ³Hanson Biotech Co., Ltd. 201 IACRI, Han Nam University, Daejeon 306-791, Korea, ⁴LG Household & HealthCare, R&D Park, Daejeon 305-343, Korea)

Novel cytochrome P450 hydroxylase (*CYP*) genes were isolated and characterized from *P. autotrophica* cosmid DNA library using an actinomycete *CYP*-specific PCR product as a screening probe. The cosmids containing four unique *CYP* genes (pESK601, 602, 603, 604, 605) were identified, and the four *CYP* genes were completely sequenced to be homologous to other known Actinomycetes *CYP* genes involved in various secondary metabolic pathways. Among all novel actinomycete *CYP* genes found in *P. autotrophica*, the *CYP* genes present in pESK601 were revealed to be highly homologous to the *CYP* genes involved in polyene-type amphotericin and nystatin antibiotic biosynthesis. The nucleotide sequences of the *CYP* flanking region in pESK601 also revealed the polyene-type biosynthetic genes, implying the presence of a cryptic polyene-type antifungal biosynthetic gene cluster in *P. autotrophica*.