

Alcaligenes sp. J-482로부터 분리한 제한 효소 AspJI의 특성

이정택 · 조태주 · 임재윤*

충북대학교 자연과학대학 미생물학과 · 생화학과

자연계에서 새로운 제한효소 생산균을 검색하여 한 균주를 선발하고, 형태학적, 생리학적, 생화학적 특성들을 조사하여 *Alcaligenes sp.*로 동정하고 제한효소의 특성을 조사하였다. *Alcaligenes sp. J-482*가 생산하는 제한효소를 *AspJI*으로 명명하였다. *AspJI*은 pBR322, Adenovirus 2-DNA, λ DNA 등에 대한 절단양식이 *AatII*와 같아 *AatII*의 isoschizomer로 추정 되었으며, 효소활성에 12.5 mM 이상의 MgCl₂를 필요로 하였으며, NaCl에 의하여 저해되었다. *AspJI*의 반응 최적 온도는 37°C, 최적 pH는 7.5로 확인 되었으며, 내열성을 조사한 결과 85°C이상에서 15분처리 할때 완전히失활되는 것으로 관찰되었다.

KEY WORDS □ type II restriction endonuclease, isoschizomer, *Alcaligenes sp.*, *AspJI*

Type II 제한효소는 1970년 Smith (5)에 의하여 *Haemophilus influenza*로부터 *HindII*가 최초로 발견된 이후 지금까지 2400여종의 제한효소들이 다양한 세균으로부터 발견되었으며, 아직도 새로운 제한효소들이 계속 알려지고 있다 (4). Type II 제한효소는 인식부위 안의 특정 부위, 혹은 인식부위에서 짧게 떨어진 부위에서 절단작용이 일어나며 같은 인식부위에서 변형 (methylation)이 일어난다. 제한효소는 현재 분자생물학에서 중요한 문제점인 단백질과 DNA의 특이적 상호작용에 대한 연구 대상으로서도 큰 가치를 가지고 있다. *EcoRI*과 *EcoRV*를 제외하고는 구조와 기능의 연관 관계에 대한 연구는 아직 미비하지만 *EcoRI*과 *EcoRV*는 촉매부위의 기본적인 특성을 공유하고 있다고 밝혀졌고 (2), *BamHI*을 비롯한 몇몇 효소에 대해서도 이러한 연구가 진행되고 있다 (7).

Type II 제한효소는 유전공학에서 DNA 재조합 기술이 발전할 수 있도록 가능케 한 중요한 원인이었으며 유전자 지도 작성, DNA 구조의 분석 및 조작, 재조합 DNA 제조 등에서 필수적인 도구로서 이용되고 있다. 현재에도 새로운 실험기술의 발전을 위해서 새로운 특성을 가지는 효소의 발견과 이용이 요구되고 있다. 최근에는 고등생물의 유전자를 분석하려는 시도가 활발해짐에 따라 8 bp 이상의 염기서열을 인식하는 제한효소의 필요가 증가되고 있다. 따라서 유전자 조작의 다양성과 용이함을 위하여 새로운 제한효소를 찾으려는 노력은 지속적으로 그 의미를 가질 것이다.

본 연구에서는 지금까지 발견된 제한효소와 인식부위의 염기서열이 전혀 다른 새로운 기질 특이성을 갖는 제한효소나 혹은 기존에 발견된 제한효소와 기질 특이성은 동일하더라도 속주 세균, 반응조건의 염농

도 (NaCl), 이온농도, pH, 반응온도 등에서 차이를 보이거나 또는 정제과정에서 수율이 높고 더 순수한 isoschizomer를 얻기 위하여 자연계에서 폭 넓게 검색하여 생산균을 동정하고 효소의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

제한효소 생산균주의 선발 및 동정

제한효소 활성을 탐색하기 위해 자연계로부터 356 균주들을 순수 분리하였으며, 본 실험실에서 그동안 분리하여 보관하고 있는 150균주들도 포함시켰다. 대상균주는 모두 영양 한천 평판배지 (Difco Co. 에서 단일 집락으로 분리한 후, 영양 액체배지에 접종하여 30°C에서 하룻밤 동안 진탕 배양하였다.

배양액을 4500×g에서 10분간 원심분리하여 균체를 회수한 후 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)로 세척하고 -20°C에서 사용전까지 보관하였다.

조추출액의 제조 : 모든 과정에서 사용된 완충 용액은 20 mM K₂HPO₄, 20 mM KH₂PO₄ (Junsei Chemical Co.), 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM EDTA (Sigma Co.), 5% (v/v) glycerol (Junsei Chemical Co.)로 조성하여 사용하였으며, pH는 7.5로 고정하여 사용하였다. -20°C에 보관되어 있던 균체 1g 을 4배의 완충용액에 용해시킨후, ultrasonication하여 균체를 분쇄하였다. 이때 온도상승을 막기 위해서 얼음을 채운 상태에서 30초 간격으로 30초 동안 10회 sonication 하였다. 이를 12,000×g에서 20분간 원심분리하여 cell debris를 제거하고 상층액을 얻었다.

제한효소 활성의 분석 : DNA 기질로는 *E. coli* strain W3110에서 분리한 wild type bacteriophage

의 DNA (Sigma Co.)를 사용하였다. 반응 혼합액은 10×반응 완충용액 1 μ l, DNA 0.25 μ g, 증류수 6 μ l, 조효소 용액 2 μ l로 조성하였다. 반응 혼합액을 60분간 37°C에서 유지하였다가 얼음에 옮겨 온도를 낮춤으로써 반응을 종결시켰다.

제한효소마다 최적 반응조건에는 상당한 차이가 있으며 이를 결정하는 여러가지 요인들이 있다. 따라서 각 균주마다 제한효소 활성을 탐색하기 위해 10×반응 완충용액을 3가지 사용하였다. 그리고 반응시간이나 반응 혼합물 내의 효소용액의 양을 달리 조절하기도 하였다. 이때 사용한 3가지 10×반응 완충용액은 100 mM Tris-HCl, 125 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol (Sigma Co.)을 공통적으로 포함하였으며, 최적조건을 알아내기 위해서 pH는 Tris-HCl로 변화시켰고 NaCl의 농도를 0, 500, 1000 mM로 달리 하여 3가지 10×반응 완충용액을 구분하였다.

반응 결과는 0.8% agarose gel (Sigma Co.)에서 전기영동하여 알아 보았다. 반응 혼합액에 6×sample loading buffer [0.25% bromophenol blue, 40% (w/v)sucrose in water]를 첨가하여, TBE 완충용액 (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA)에서 전기영동하였다.

균주의 동정: 자연계에서 선발한 제한효소 생성 균주의 동정을 위해 형태적 특징, 배양적인 특징, 생리학적 특징 등을 알아 보았다. 그리고 정확한 동정을 위해 GN & GP MicroPlates kit (Biolog Inc.)를 사용하였으며, 형태적 특징을 알아보기 위해 전자 현미경을 사용하였다. 그리고 영양 한천 평판 배지에서 집락의 형태를 관찰하였으며, 동정 kit를 사용한 실험의 정확성을 위해 보완실험을 하였다. 보완 실험은 동정 kit로 확인할 수 없었던 사항에 대해 Harold (1)의 방법으로 조사하였다.

균주의 보관 및 배양

균주는 영양한천 평판배지에서 단일 colony를 분리하여 계대배양함으로써 보존하였다. 그리고 계대배양 동안 효소의 활성이 없어지는 것에 대비하여 균주를 -70°C에 보존하였다. 본 배양은 단일 colony를 취하여 seed media에서 이를 배양한 후 영양 액체배지에 접종, 30°C에서 15시간 배양하였다. 5 l jar가 부착된 발효조 (한국발효기)에 배지 3 l를 넣고 통기량 1 vvm, 교반속도 300 rpm으로 유지하였다. 배양 후 4500×g에서 15분간 원심분리하여 균체를 수거한 다음, 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)로 세척하고 -20°C에 사용 전까지 보관 하였다.

제한효소의 분리

조추출액의 제조: 제한효소 활성을 탐색할 때와 같은 완충용액을 사용하였으며, 모든 과정은 저온 (4°C)에서 수행하였다. -20°C에 보관되어 있던 균체 10 g을 40 ml의 완충용액에 용해시킨 후, 얼음을

채운 상태에서 30초 동안 15회 sonication하였다. 이 용액을 12,000×g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 모았다.

Column chromatography: 완충용액에 섞은 DEAE-Sephadex A-50 (Pharmacia Chemical Co.)을 2.7 (ID)×12 cm column (Vt=75 ml)에 80 ml/hr로 packing하고 2배의 완충용액을 흘려 평형시켰다. 여기에 sonication하여 얻은 조추출액을 40 ml/hr로 얻었다. 50 ml/hr의 속도에서 완충용액 200 ml로 세척한 뒤, 완충용액의 농도를 20~500 mM로 일정한 농도 기울기를 걸어 300 ml로 용출하였다. 각각의 분획은 4.5 ml씩 일정하게 용출시켰다. 그리고 모든 분획들은 280 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 단백질양을 정량하였다. 제한효소 활성을 가지고 있는 분획의 용출액을 모아 완충용액에서 6시간씩 2차례 투석 하였다. 투석이 끝난 용액을 ultrafiltration membrane (Amicon, PM10.)으로 농축하였다.

완충용액으로 안정화 되어있는 Sephadex G-75 (Sigma Co. USA)를 2.0 (ID)×80 cm column (Vt=50 ml)에 20 ml/hr로 packing하고 5배의 완충용액을 흘려 평형시켰다. Column에 농축된 DEAE-Sephadex 용출액을 얻고, 20 ml/hr의 속도로 250 ml의 완충용액을 흘려 제한효소를 용출 시켰다. 각각의 분획은 6 ml씩 일정하게 용출시켰다. 그리고 모든 분획들은 280 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 단백질양을 정량하였다. 활성이 있는 분획을 모아 ultrafiltration membrane으로 농축하였다.

제한효소 활성의 분석

E. coli strain W3110에서 분리한 wild type bacteriophage λ DNA를 기질로 사용하였다. 반응 혼합액은 10×반응 완충용액 1 μ l, DNA 0.25 μ g, 증류수 6 μ l, 조효소 용액 2 μ l로 조성하였다. 제한효소 활성을 탐색할 때와 마찬가지로 조성된 반응 혼합액을 60분간 37°C에서 반응 시키고, 얼음에 10분간 두어 반응을 종료시켰다. 10×반응 완충용액은 NaCl이 들어 있지 않은 것을 사용하였다. 정제과정에서 각각 분획된 용출액을 기질 DNA와 반응시켜 제한효소 활성이 존재하는 분획을 구분하였다. 반응 결과는 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 알아 보았다. 반응 혼합액에 6×sample loading buffer [0.25% bromophenol blue, 40% (w/v)sucrose in water]를 첨가하여, TBE 완충용액 (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA)에서 전기영동 하였다.

제한효소의 특성 분석

Gel filtration column chromatography 과정까지 거친 부분 정제된 효소 용액을 알맞게 희석하여 사용하였으며, 10×반응 완충용액은 정제된 제한효소의 활성을 높이기 위해 최적조건을 결정한 뒤 사용하였다. 반응 최적 조건을 찾기 위해 10×반응 완충용액의 pH, MgCl₂ 농도, NaCl 농도 등을 달리 조절하였다. 열에 대한 안정성을 알아보기 위해서는

효소용액 10 μ l 물 1 ml/ microtube 에 넣고 각각의 온도에서 15분간 처리한 후 효소활성을 측정하였다. 양이온들이 효소활성에 미치는 영향을 알아보기 위해서 효소 반응액에 모든 양이온들이 chloride 형태로 첨가되었으며, 활성 분석은 위의 방법과 같이하였다. 최적 반응 온도를 알아보기 위해서 각 온도에 따라 효소활성을 측정하였다. 이 제한효소는 *AatII*와 λ DNA 분해 양상이 비슷하게 나타났기 때문에 *AatII* (Promega.)를 사용하여 pBR322 (Sigma Co.), Adenovirus-2 DNA (Sigma Co.) 등 다른 여러가지 기질 DNA들에 대한 분해 양상을 비교하였다.

결과 및 고찰

제한효소의 탐색

자연계에서 분리한 균주들과 이미 실험실에서 분리하여 보관되어 있던 균주들을 대상으로 제한효소의 활성을 탐색하였다. 500여 균주 중에서 제한효소의 활성이 높은 균주를 찾기 위해 균주마다 액체배양한 후 sonication 방법으로 조추출액을 얻었다. 506 균주 중에서 J-482 균주로부터 새로운 제한효소라고 추정되는 제한효소의 활성이 발견되었다 (Fig. 1). 대부분의 제한효소는 변형 (methylation)된 인식 염기서열에는 작용을 하지 못하기 때문에 이점을 고려하여 *E. coli*의 methylation-defective 돌연변이체 (*dam*⁻, *dcm*⁻)인 GM 119로부터 분리한 non-methylated lambda DNA를 기질로 사용하였다.

제한효소 생성균주 (J-482)의 동정

GN & GP MicroPlates kit (Biolog Inc.)를 사용하여 실험한 후 data base에서 homology를 조사한 결과 *Alcaligenes faecalis*와 homology가 가장 높았다. 이를 바탕으로 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (3)을 참조하여 형태적, 배양적 (Table 1), 생리학적 (Table 2) 특성들을 조사하였다. 그리고 형태적 특징을 더 자세히 관찰하기 위해서 전자 현미경 (Hitachi, S-570)을 사용하였다 (Fig. 2). 그 결과 *Alcaligenes* 속에 속함을 알 수 있었다. 따라서 J-482가 생산하는 제한효소를 속명 'A'와 species의 'sp'에 J-482의 'J'를 붙여 *AspJI*으로 명명하였다.

제한효소의 정제

DEAE Sephadex A-50에 *Alcaligenes* sp. J-482의 조추출액을 흡착시킨 후 20~500 mM의 완충용액으로 농도 기울기를 주어 용출시켜 본 결과 180~330 mM 사이에서 제한효소가 용출되었다. 제한효소 활성을 갖는 분획을 모아 ultrafiltration한 후 농축된 제한효소를 Sephadex G-75로 계속 정제하였다. 완충용액으로 용출시킨 결과 22~26번 분획에서 제한효소가 용출되었다. 제한효소 활성을 갖는 부위를 모아 다시 ultrafiltration한 후에 농축된 제한효소를 분획에서 제한효소가 용출되었다. 제한효소 활성을

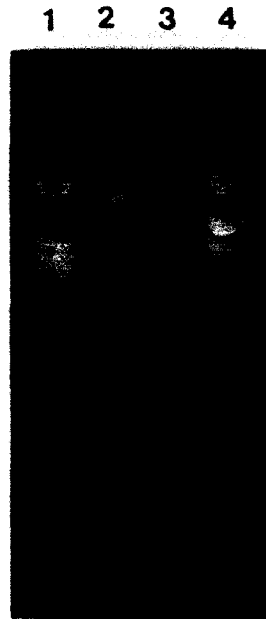


Fig. 1. Cleavage pattern of lambda DNA by the crude enzyme from *Alcaligenes* sp. J-482.

1 μ g of non-methylated λ DNA is cleaved with crude enzyme in 10 μ l incubation mixture for 1 hr (lane 2, 3). Fragments of λ DNA cut with *EcoRI* or *HindIII* were used as size markers, respectively (lane 1,4).

Table 1. Morphological and cultural characteristics of *Alcaligenes* sp. J-482 strain.

Characteristics	Strain J-482	<i>Alcaligenes faecalis</i> *
Morphological characteristics		
1. Shape	rod	rod
2. Size		
Width	0.4~0.6 μ m	0.5~1.0 μ m
Length	1.5~1.8 μ m	0.5~2.6 μ m
3. Motility	+	+
4. Gram stain	negative	negative
Cultural characteristics		
1. Optimum growth temperature	30°C	20~37°C
2. Oxygen dependence	obligate aerobic	obligate aerobic

* Type strain.

갖는 부위를 모아 다시 ultrafiltration 한 후 농축된 제한효소를 얻었다. 최종 정제 후 효소의 정제도는 38.9배 이었으며, 정제 수율은 4.3%로 8,386 unit/mg protein의 specific activity를 보였다.

제한효소의 특성

제한효소의 활성에 영향을 줄 수 있는 pH, 온도,

Table 2. Physiological characteristics of *Alcaligenes* sp. J-482 strain.

Characteristics	Strain J-482	<i>Alcaligenes faecalis</i> *
Physiological characteristics		
1. Oxidase	+	+
2. Catalase	+	+
3. Hydrolysis		
Gelatin	-	-
Starch	-	-
4. Nitrate reduction	+	+
5. Voges-Prokauer test	-	-
6. Methyl red test	-	-
7. Indole production	-	-
8. Citrate degradation	+	+
9. Urea degradation	-	-
10. Carbohydrate utilization		
D-Glucose	-	-
L-Arabinose	-	-
D-Sorbitol	+	-
D-Mannitol	-	-
Sucrose	-	-
D-Mannose	-	-
D-Galactose	-	-
11. Organic acid utilization		
Acetate	+	+
Succinate	+	+
Propionate	+	+
Lactate	+	+
β -Hydroxybutyrate	+	+
Malate	+	+
α -Ketoglutarate	+	+
12. Amino acid utilization		
L-Alanine	+	+
L-Aspartate	+	+
L-Glutamate	+	+
L-Histidine	-	+
L-Phenylalanine	+	+
L-Threonine	+	+
L-Serine	-	-
L-Proline	+	+

*Reference strain: +, positive; -, negative.

MgCl₂ 농도, NaCl 농도 등과 같은 요인에 따른 *AspJI*의 최적 반응조건을 결정하였다. 그 결과, pH 7.5에서 가장 높은 활성을 보였으며 같은 pH에서는 완충용액의 조성에 의해 그다지 영향을 받지 않았다. 또 이 효소의 최적 반응 온도는 37°C이었다. 한편, 이 제한효소가 활성을 가지기 위해서는 12.5 mM 이상의 MgCl₂가 반드시 필요한 것으로 나타났는데, cofactor로서 Mg²⁺ 이온을 요구하는 것은 type II 제한효소의 일반적인 특성이다. *EcoRI*과 *EcoRV*를 대상으로 한 구조 연구의 결과, 제한효소와 결합할 때 DNA가 변형 (deformation)됨으로써 반응성을 가진



Fig. 2. Scanning electron microscopic observation of *Alcaligenes* sp. J-482.

Colony of the *Alcaligenes* sp. J-482 was layered on nutrient agar plate. Scanning electron microscopic observation was performed by Hitachi Model S-570 at the magnitude of 10,000 fold.

인산기가 활성 부위에 위치하도록 하고 동시에 Mg²⁺에 대한 결합 부위도 완성시킨다고 한다 (7). 어떤 제한효소의 경우에는 다른 양이온이 Mg²⁺ 이온을 대체할 수 있는 것으로 알려져 있으나, *AspJI*에 대해서는 시험해 본 어떠한 양이온도 Mg²⁺ 이온을 대체하지 못하였다.

반응 혼합액에 NaCl이 없을 때 제한효소의 활성이 가장 높았으며, Type II 제한효소의 일반적인 특징대로 ATP를 요구하지 않았다.

지금까지의 과정에서 시험해 본 모든 반응 조건에서 *AspJI*의 인식 염기서열은 변함이 없이 lambda DNA에 대하여 똑같은 절단 양상을 유지하였다. 반응 조건에 따라 염기 서열에 대한 특이성이 변화 또는 완화되는 예 (star activity)가 많이 있지만 이 효소의 경우에는 이러한 조건이 발견되지 않았다.

*AspJI*은 65°C에서 15분간 열처리를 하여도 활성을 대부분 유지하였으나, 85°C에서 처리한 경우 완전히 불활성화되었다. 대부분의 제한효소는 65°C에서 15분간 처리하면 불활성화되는 것과 비교할 때 이 제한효소는 비교적 열에 안정한 효소임을 알 수 있었다. *AspJI*와 isoschizomer인 *AatII*는 65°C에서 15분간 처리하면 불활성화된다고 알려져 있다 (6).

Alcaligenes sp. J-482로부터 발견된 제한효소를



Fig. 3. Cleavage patterns of lambda DNA, pBR322, Adenovirus-2 DNA by the partially purified *AspJI* and *AatII*. 0.25 µg of DNAs were digested with the partially purified *AspI* and *AatII*, respectively for 1 hr in appropriate reaction mixture. Cleavage patterns were examined by electrophoresis on a 0.8% agarose gel. Lane 1. Adenovirus-2 DNA/*AatII*; Lane 2. Adenovirus-2 DNA/*AspJI*; Lane 3. pBR322/*AatII*; Lane 4. pBR322/*AspJI*; Lane 5. λ DNA/*AatII*; Lane 6. λ DNA/*AspJI*; Lane 7. λ DNA/*HindIII*.

부분정제하여 다양한 기질 DNA 와 반응시켜본 결과, pBR322, Adenovirus 2-DNA, 그리고 λ DNA 를 절단할 수 있었다. 그 절단양상은, 여섯 개의 염기 서열 5'-GACGT↓C-3'을 인지하여 4 base가 돌출된 3' 말단을 만드는 *AatII*에 의한 절단양상과 비슷한 것으로 나타났다. *AatII*와 인식부위가 같은지 확인하기 위하여 이 기질 DNA들을 부분정제한 제한효소와 반응시키고 같은 방법으로 *AatII*와도 반응시킨 다음 전기영동으로 절단양상을 비교한 결과, 같은 DNA band pattern 이 나타남을 관찰하였다. (Fig. 3). 또한 최적 반응조건과 10X 반응 완충용액의 조성을 비교한 결과 서로 다른 특성을 보여 주었다. 이러한 사실로 미루어, 본 연구에서 얻은 *AspJI*은 *Acetobacter aceti*에서 분리된 제한효소인 *AatII*의 isoschizomer로 추정할 수 있었으며, *AatII*보다 내열성이 높은 효소로서 (Table 3) 유전자조작 실험에 이용가능 할 것으로 생각된다.

감사의 글

Table 3. Comparison of characteristics of the partially purified *AspJI* and *AatII*.

Characteristics	Partially purified <i>AspJI</i>	<i>AatII</i>
1. Source microorganism	<i>Alcaligenes</i> sp. J-482	<i>Acetobacter aceti</i>
2. Optimum condition for enzyme activity		
1) Temperature	37°C	37°C
2) pH	7.5	7.5
3. 10× Reaction buffer		
1) Tris-Cl (mM)	15	10
2) MgCl ₂ (mM)	12.5	7
3) NaCl (mM)	0	0
4) KCl (mM)	0	50
5) DTT (mM)	1	1
4. Heat inactivation (°C)	85°C	65°C

본 논문은 충북대학교 학술재단의 연구비(1992년)로 이루어 졌으며, 연구결과의 일부는 1992년도 과학재단 우수연구센터 (서울대학교 분자 미생물학 연구센터)의 연구비로 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Harold, J.B., 1990. Microbiological applications. 5th ed. Wm. C. Brown Publishers, Dubuque.
2. Jeltsch, A., J. Alves, G. Mass, and A. Pingoud, 1992. On the catalytic mechanism of *EcoRI* and *EcoRV*. *FEBS* 304, 4-8.
3. Kersters, K. and J.D. Ley, 1984. Genus *Alcaligenes*. p. 361. In N.R. Krieg and J.G. Holt (ed.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*. The Williams & Wilkins Co. Baltimore.
4. Roberts, R.J. and D. Macelis, 1992. Restriction enzymes and their isoschizomers. *Nucl. Acids Res.* 20, 2167-2180.
5. Smith, H.O. and K.W. Wilcox, 1970. A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae* 1: Purification and general properties. *J. Mol. Biol.* 51, 379-391.
6. Sugisaki, H., Y. Maekawa, and M. Takanami, 1982. New restriction endonucleases from *Acetobacter aceti* and *Bacillus aneurinolyticus*. *Nucl. Acids Res.* 10, 5747-5752.
7. Winkler, E.K., 1992. Structure and function of restriction endonucleases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2, 93-99.

(Received May 10, 1994)

(Accepted June 9, 1994)

ABSTRACT: Characterization of a Restriction Endonuclease *AspJI* from *Alcaligenes* sp. J-482

Lee, Jeong-Taek, Tae-Ju Cho, and Jai-Yun Lim* (Department of Microbiology and *Department of Biochemistry, Cheong-Ju 360-763, Korea)

About 500 bacterial and fungal strains from a wide variety of natural habitats were screened for a new type II restriction endonuclease. Among the 500 species, we selected one species that produced a new restriction endonuclease. This strain has an optimum temperature of 30°C for growth. Morphological, cultural, and physiological characteristics were examined for identification of the isolated strain J-482. This strain was found to belong to the genus *Alcaligenes*. The restriction endonuclease was named as *AspJI* and partially purified from *Alcaligenes* sp. J-482 by DEAE-Sephadex A-50 column chromatography and gel filtration. Most of other nucleases were removed by the purification steps. The *AspJI* has a substrate specificity to λ DNA, pBR322 and Adenovirus-2 DNA. For its maximal activity, the isolated enzyme requires MgCl₂, which should be at least 12.5 mM and it does not need any other cofactors. It is maximally active in the absence of NaCl and is completely inactivated at 100 mM NaCl. The pH and temperature optima for activity were pH 7.5 and 37°C, respectively. The DNA fragments generated by digesting λ DNA, pBR322, and Adenovirus-2 DNA with *AspJI* were the same as that produced by *AatII*. This suggests that *AspJI* is an isoschizomer of *AatII*.