

オートラジオグラフィーによる トリ肉腫ウイルス感染脱核鶏胎線維芽細胞内 プロウイルスDNA合成に関する研究

岡山大学医学部癌源研究施設生化学部門（主任：小田琢三教授）

大学院 田中輝和

〔昭和52年3月26日受稿〕

序 論

Baltimore (1)及び Temin & Mizutani (2)によつて、1970年にそれぞれ独立に、二種の RNA 型腫瘍ウイルスの virion 中に、DNA ポリメラーゼ活性が存在することが、見出され、しかも、その反応が、ウイルス RNA を鋳型にした、RNA 依存 DNA ポリメラーゼ (Reverse transcriptase, 逆転写酵素) によるものであることが確認された。その後、他の RNA 型腫瘍ウイルスにも逆転写酵素活性が存在することが認められ (3, 4, 5, 6, 7) さらに virion 中には、DNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性も存在することが明らかになった (7, 8, 9)。

一方、Hill & Hillova (10)は Prague 株のラウス肉腫ウイルス (PR-RSV) でトランスフォームしたラット細胞 (XC 細胞) から DNA を分離し、鶏胎線維芽細胞 (CEF) に感染 (DNA トランスフェクション) させることにより、CEF がトランスフォームすると同時に、この CEF から PR-RSV そのものが回収されることを見出した。即ち、XC 細胞の DNA 中には、PR-RSV の完全なプロウイルス DNA が組込まれていたことが示された。

一般に、RNA 型腫瘍ウイルスは、感受性細胞に感染すれば、そのウイルスゲノムである RNA は、virion 中に存在する逆転写酵素により、プロウイルス DNA に逆転写され、DNA 依存 DNA ポリメラーゼにより二重鎖 DNA となり、最終的に、宿主細胞染色体 DNA 中に組込まれ、安定化される。このプロウイルス DNA が宿主細胞のどの部位で合成されるか——細胞質か、核か——に関しては、Hatanaka et al. (11), Kakefuda et al. (12) 及び Dales & Hanafusa

(13)の間で互いに相反する結果が報告されている。

本研究において、トリ肉腫ウイルスのプロウイルス DNA の合成が、宿主細胞のどの部位で行なわれるかを検索するために、Prescott et al. (14) により見出された、cytochalasin B 存在下で遠心操作を行なう方法によつて、CEF を enucleate (脱核) し、その脱核した CEF (cytoplast) に B 77 株のトリ肉腫ウイルス (B 77-ASV) を感染させた。その結果、プロウイルス DNA は、CEF の cytoplast 内で、核の直接的な作用なく合成され得ること、しかも、その DNA 合成が、逆転写酵素の特異的阻害剤により阻止されることを、オートラジオグラフィーで確認したので報告する。

材 料 と 方 法

(1)細胞

財団法人阪大微生物病研究会観音寺研究所より供与された specific pathogen free, ALV-gs(-), C/BE の受精鶏卵を、11日間孵化させた胎児から、トリプシン処理によつて得た鶏胎線維芽細胞 (CEF) を primary culture した。growth medium としては、10% 仔牛血清、10% triptose phosphate broth 及び 100 µg/ml ペニシリンを含む Eagle's MEM を使用した。

(2)ウイルス

トリ肉腫ウイルスの B 77 株 (B 77-ASV, subgroup C) を使用した。このウイルスは、南カリフォルニア大学の P. K. Vogt 博士より恵与されたものを継代したものである。約 10^8 FFU/ml の感染価のウイルスを含む培養液上清 0.1-0.5 ml を、secondary culture した CEF に、2 µg/ml の polybrene 存在下

に感染させ、継代をくり返しているものを使用した。

(3) Enucleation procedure

a) Plastic disc coverslip の作製

新しい100 mm-ファルコン製培養用プラスチックシャーレの底部より、日立超遠心機ローターRPS-25-2Aの遠心管の内径に合わせて円盤状に切り出したものを、plastic disc coverslip とし、95%エタノールで洗浄後、15W殺菌燈直下20cmにて30分照射して滅菌後使用した。

b) Cell seeding

Primary culture 3日目で、ほぼconfluentになったCEFを0.05%トリプシンを含むphosphate buffer saline (PBS) で処理して剝離し、遠心してトリプシンを除いた後growth mediumにsuspendした。そのcell suspensionを上記のcoverslipを入れた100 mm-培養用プラスチックシャーレに $2-3 \times 10^6$ /dishの細胞濃度になるようにseedingし、一晚培養した。

c) Enucleation medium

Dimethyl sulfoxide (DMSO) 中に1 mg/mlの濃度にcytochalasin B (CB) (Aldrich製)を溶解し、4℃にて貯蔵した。このCB溶液を加え、最終的に10 μ g/ml CB、10%仔牛血清を含むEagle's MEMをenucleation mediumとして使用した。

d) Enucleation

あらかじめ37℃に暖めたenucleation mediumを入れた遠心管に、細胞の付着した面を底部に向けてcoverslipを固定し、日立ローターRPS-25-2Aにて、10000 rpm (17500 x g)、37 \pm 2℃で15分間遠心することによって脱核CEF (cytoplast) を調製した。

e) Cytochalasin Bの除去

遠心後、coverslipを遠心管から取り出し、growth mediumで洗い、CBを除いた後、新しいgrowth medium中に入れて、37℃、30分incubateした。この間に、CBによるcytoplastの形態変化は、正常のCEF様に回復する。

(4) Cytoplast へのウイルス感染

Cytoplastをpolybreneで前処理し、約10⁸FFU/mlの感染価のB77-ASVを含む培養液上清を、各coverslip当り0.05mlずつ加え、室温で約10分間ウイルスを吸着させた後inoculation medium (10 μ Ci/ml ³H-チミジン [specific activity 50Ci/mmol]、2 μ g/ml polybreneを含むgrowth medium)を加え、CO₂-incubatorで39℃6.5時間

incubateした。コントロールのcytoplastには、ウイルスを含まない培養液でmock infectionを行ない、同じ条件でincubateした。

(5) N-demethyl rifampicin によるDNA合成阻害

上記の方法でB77-ASVを吸着させたcytoplastに、Gruppo Lepetit社(Milano, Italy)より恵与されたN-demethyl rifampicin (AF/AP) 400 μ g/mlを含むinoculation mediumを加え、同条件下でincubateし、ウイルス感染によるDNA合成が阻害され得るかどうかを検索した。

(6) 固定およびDNase I処理

6.5時間incubation後、coverslipをPBSで3回洗い、99.5%メタノールで5分間固定した。ウイルスを感染させたcoverslipのうち数枚を、固定後10 μ g/ml RNase free DNase I (Worthington Biochemical Corporation製)を含む10mM Tris-HCl、0.15M NaCl、3mM MgCl₂ (pH 7.7)で、37℃、1時間処理した。他のcoverslipはDNase Iを含まない同緩衝液中で、同条件下で処理した。

(7) 光顕オートラジオグラフィ

以上の操作の後、すべてのcoverslipを2%過塩素酸(PCA)で、PCAを交換しながら3回洗い、酸可溶性分画を除いた。その後、オートラジオグラフィ用乳剤(SAKURA NR-M2)をcover slipにcoatし、暗箱中に入れ4℃で4週間露出した後、現像、定着操作を施し、Giemsa染色後、光学顕微鏡で観察した。

(8) 電顕オートラジオグラフィ

³H-チミジン存在下でB77-ASVを感染させたcytoplastをPBS中でpolicemanにより剝離し、遠心後ペレットを2%四酸化オスミウムを含む0.1M cacodylate buffer (pH 7.2)で1時間固定後、エタノール、プロピレンオキシドによる一連の脱水処理を施し、Epon 812に包埋した(15)。包埋試料を、ガラスナイフを操着したSoval MT-2ウルトラミクロトームで超薄切片とし、1%酢酸ウラニル、クエン酸鉛で染色後、電顕オートラジオグラフィ用乳剤(SAKURA NR-H2)でcoatし、暗箱中に入れ、4℃、3週間露出した。露出後、現像、定着処理を行ない、クエン酸鉛で後染色して、日立11-C電子顕微鏡にて観察した。

実 験 結 果

Enucleation (脱核)

Coverslip上で一晚培養したCEFを、cytochala-

sin B (CB) 存在下 $37 \pm 2^\circ\text{C}$ で遠心することにより, coverslip 上のCEF は95%以上がenucleate (脱核)され, cytoplasm となっていた。「材料と方法」の項に記した条件で, 一枚のcoverslip 当り平均 2×10^6 のcytoplasm が得られた. coverslip 上のCEFの一部は, 遠心操作中に剝離し, 核 (Karyoplast) と共に, 遠心管底にペレットとして集められる. 脱核操作後, CB を含まないgrowth medium 中で, 37°C , 30分incubate することにより, 形態変化を来していたcoverslip 上のcytoplasm は, もとの線維芽細胞様形態に回復する.

光顕オートラジオグラフィ

B77-ASV をCEF cytoplasm にmoi (multiplicity of infection) 約25で吸着, 感染後, ^3H -チミジン $10 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ を含むinoculation medium で6.5時間incubate すると, そのcytoplasm 内に photopositive grain の出現することが, 光顕オートラジオグラフィで確かめられた (図2). 一方, mock infection にて同操作を行なったコントロールのcytoplasm 内には, オートラジオグラフ上で, photopositive grain の出現はほとんど見られなかった (図1). ただ, 残った一部のintact cell の核内には photopositive grain が高密度に出現していた (図1).

RNase free DNase I 処理

ウイルス感染したcytoplasm を, メタノール固定後, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のRNase free DNase I で処理することにより, photopositive grain の出現は見られず, 核の残った一部の細胞は, 核内DNA が部分消化されて, その photopositive grain の密度が減少していた (図3). 故に, この photopositive grain は, B77-ASV 感染により cytoplasm 内で新たに合成された酸不溶性高分子DNA であり, ^3H -チミジンが分解後, DNA 合成以外に利用されたことにより出現したのではないと考えられる.

N-demethyl rifampicin (AF/AP) 処理

B77-ASV 吸着, 感染後, 逆転写酵素の特異的阻害剤である N-demethyl rifampicin (AF/AP) $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む inoculation medium で incubate すると, そのcytoplasm 内の photopositive grain の出現が, ほぼ完全に阻害される (図4). この実験事実から, 上記の photopositive grain の出現は, B77-ASV virion 中に含まれる逆転写酵素反応により合成されたプロウイルスDNA によるものと考えられる. 一方, 一部のintact cell の核内DNA 合成は,

$400 \mu\text{g}/\text{ml}$ AF/AP では, ほとんど阻害されなかった (図4).

電顕オートラジオグラフィ

B77-ASV 感染による cytoplasm 内DNA 合成が, ミトコンドリアによるものではないことを証明する為に, ^3H -チミジン存在下でB77-ASV を感染させた cytoplasm を集め, 超薄切片とし, 電顕オートラジオグラフィにて観察した. 図5に示される如く, ほとんどすべての photopositive grain は, ミトコンドリアとは無関係に細胞質内に出現していた. この観察結果から, B77-ASV 感染による cytoplasm 内DNA 合成は, B77-ASV そのものによるものであり, ウイルス感染により活性化されたミトコンドリアによるものではないと考えられる.

考 察

RNA 型腫瘍ウイルスが感受性細胞に感染すれば, そのウイルスゲノムであるRNA は, virion 中に存在する逆転写酵素によりプロウイルスDNA に逆転写され, 宿主細胞核内DNA の中に組込まれ安定化される. このプロウイルスDNA の合成が, 宿主細胞内のどの部位で行なわれるかに関しては, 互いに相反する結果が報告されている. Hatanaka et al.

(11) は, マウス肉腫ウイルスをマウス胎児細胞に感染させ, DNA 合成がその細胞の細胞質内で起っていることを, オートラジオグラフィで証明している. 一方, Dales & Hanafusa (13) は, トリのRNA 型腫瘍ウイルスが, CEF の phagocytic vacuoles に取り込まれ, virion のまま速かに核に移行し, 細胞質内でのDNA 合成は見られなかった, したがって, プロウイルスDNA は, CEF の核内で合成されると判断している. その後, Kakefuda et al. (12) は, マウス肉腫ウイルスをマウス 3T3/BALB 細胞に感染させると, 形質膜にassociate して, プロウイルスDNA 合成が開始されることを, 電顕オートラジオグラフィ, 及びそのウイルス感染細胞の形質膜分画を分離して示した. さらに Varmus et al. (16) は, Pekin duck embryo fibroblast に B77-ASV を感染させ, 時間を追って細胞分画を行ない, その細胞質分画にB77-ASV-RNA に相補的なDNA が存在すること, 又脱核したその細胞のcytoplasm にB77-ASV を感染させ, それから抽出したDNA にも, B77-ASV のRNA 及びcDNA に相補的なものが存在することを報告している.

本研究において, CB 存在下で遠心することによ

り得た脱核 CEF を使い、その中でプロウイルス DNA 合成の、オートラジオグラフィによる直接的観察を行なった。CB 存在下での遠心操作による enucleation では、細胞構成成分の細胞外への漏出はほとんどなく cytoplasm を作る事が出来る。このようにして作られた cytoplasm は、 ^3H -ロイシンの取り込みで見ると、脱核後約12時間は蛋白合成能を有し、一方、DNA 合成、RNA 合成活性は、ほとんど示さないことが報告されている (14, 17, 18)。又、脱核操作中の核構成成分の cytoplasm 内への漏出に関しては、CB による脱核機構から考えて、非常に少ないものと思はれる。事実、核内 DNA ポリメラーゼ- α の cytoplasm への漏出が、この脱核操作ではほとんど見出されなかったとの報告がある (19) したがって、この方法により得られた cytoplasm は、ほぼもとの細胞の細胞質に等しく、かつ核からの特別な影響のないものと考えて良い。

この cytoplasm に B77-ASV を感染させれば ^3H -チミジンの取り込みによる photopositive grain の出現が、その cytoplasm 内に見られる。一方、mock infection によるコントロールの cytoplasm には、photopositive grain の出現は見られなかったことから、この grain は、B77-ASV 感染により直接的に惹起されたものと考えられる。しかもこの grain が、メタノール固定後の、RNase free DNase I 処理により、ほぼ完全に消失することから、酸不溶性高分子 DNA に取り込まれた ^3H -チミジンによるものであり、 ^3H -チミジンが分解された後、DNA 合成以外に利用されたことにより出現したものではない。

Rifamycin-SV の誘導体の中に、逆転写酵素反応を強く阻害するものが見出され、しかも、これら rifamycin-SV の誘導体の中に、KB 細胞 DNA ポリメラーゼ反応を、あまり効果的には阻害しないもの存在することが知られている (20)。これら rifamycin-SV の誘導体の中で、N-demethyl rifampicin (AF/AP) は、逆転写酵素反応に充分な阻害効果を見出すには、やや大量 (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を必要とするが、逆転写酵素に対する特異性は高く、この濃度では、マウス肉腫ウイルスの DNA 依存 DNA 合成反応 (21)、及び仔牛胸線の DNA 依存 RNA ポリメラーゼ反応 (22) も阻害しないことが見出されている。この AF/AP を 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 存在させることにより、B77-ASV 感染 cytoplasm 内の photopositive grain の出現が、ほぼ完全に阻害されることが観察、確認された (図4)。したがって、B77-ASV

感染 cytoplasm 内の DNA 合成は逆転写酵素反応によるものであると判断出来る。

ところで、ウイルス感染により、細胞内ミトコンドリアの DNA 合成が上昇するという報告がある。Vesco & Basilico (23) は、3T3 マウス細胞にポリオマ ウイルスを感染させると、感染後24時間から34時間の間に、核内 DNA 合成と共にミトコンドリア DNA 合成も活性化され、maximum に達することを見出している。また、Furukawa et al. (24) は、ヒト・サイトメガロウイルスを WI-38細胞に感染させ、その後12時間から18時間の間に、ミトコンドリアの DNA 合成活性が1.5 - 5倍上昇すること、しかも、ウイルスの複製及び核内 DNA 合成に先立って、ミトコンドリア DNA 合成の亢進が見られることを報告している。したがって、B77-ASV 感染による CEF cytoplasm 内 DNA 合成に対するミトコンドリアの関与を、AF/AP による阻害に加え、より一層確実に検討する為に、超薄切片電顕オートラジオグラフィを行なった。その結果、photopositive grain は、ほとんど、ミトコンドリア以外の細胞質内に出現していることが確認された (図5)。故に、B77-ASV 感染 cytoplasm 内 DNA 合成は、ミトコンドリアによるものではないと考えられる。

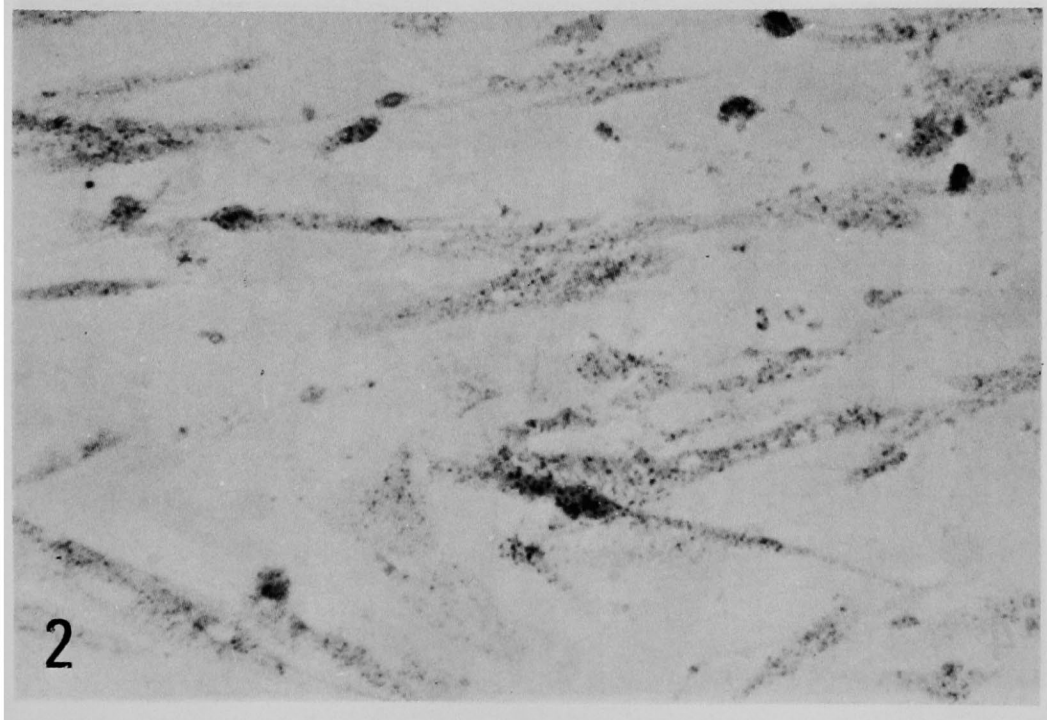
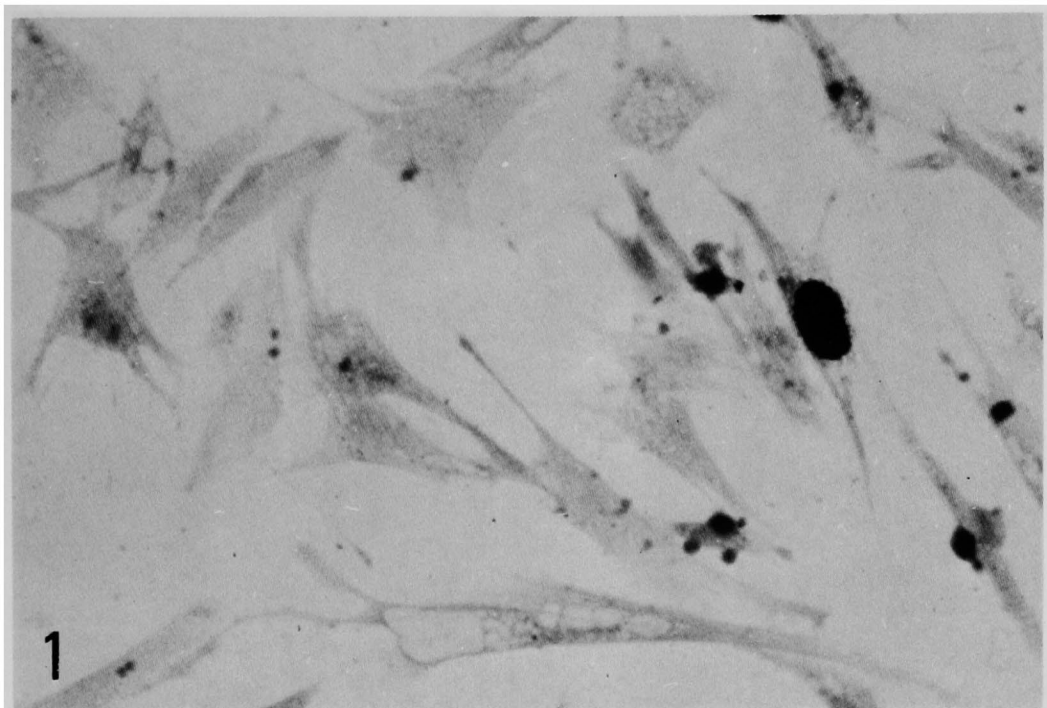
以上のことより、CEF に感染した B77-ASV のプロウイルス DNA は、核の関与なく、その細胞質内で合成が開始されるものと思われる。

結 論

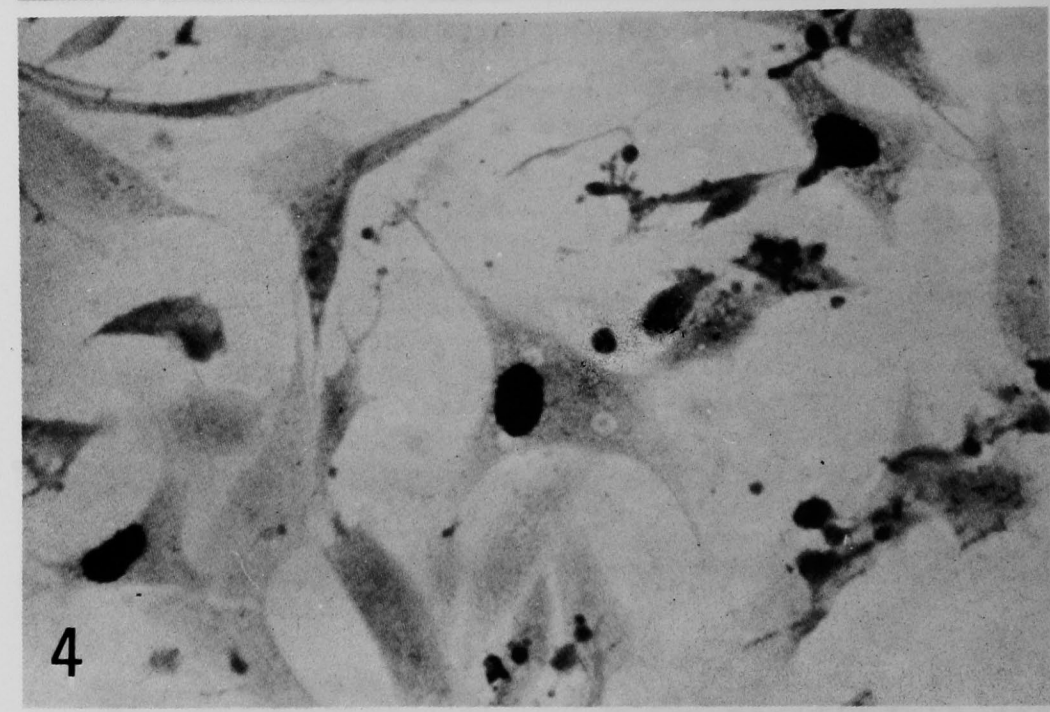
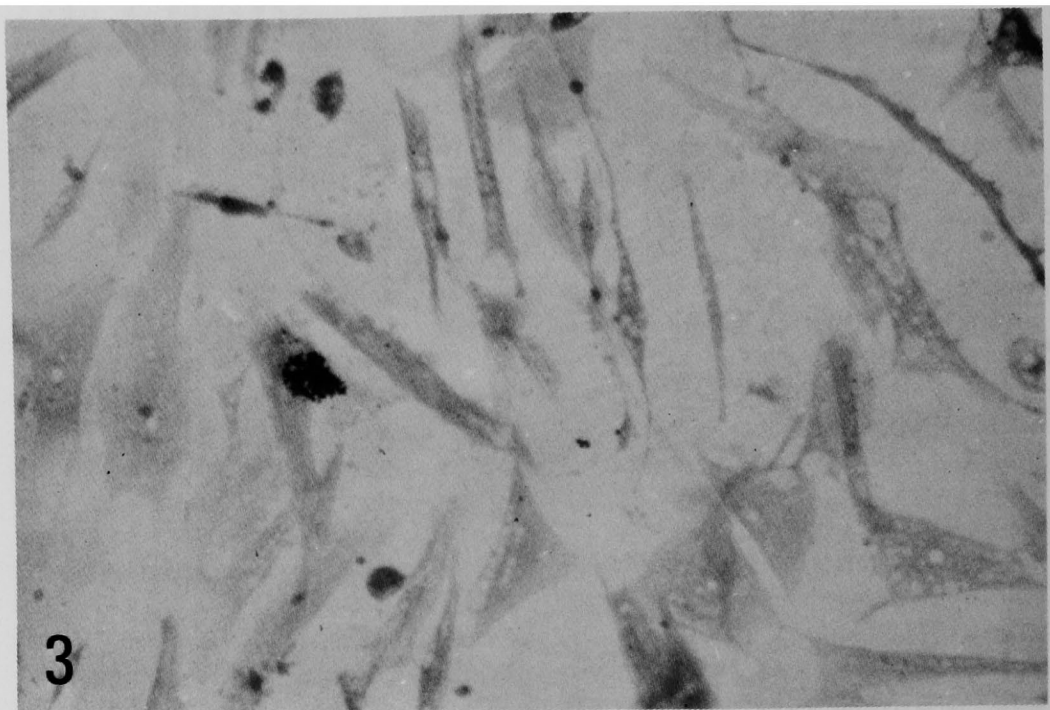
感受性細胞に感染した RNA 型腫瘍ウイルスのプロウイルス DNA が、その細胞のどの部位で合成されるか—細胞質か、核か—を検索するために、脱核鶏胎線維芽細胞 (CEF-cytoplasm) にトリ肉腫ウイルス (B77-ASV, subgroup C) を感染させ、その cytoplasm 内でのプロウイルス DNA 合成に関して、光顕・電顕オートラジオグラフィ、DNase I 処理および逆転写酵素の特異的阻害剤による阻害効果について検討し、以下の結論を得た。

1. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の cytochalasin B の存在下で、 $37 \pm 2^\circ\text{C}$ 、17500 x g、15分の遠心操作を行なうことにより CEF を脱核した。脱核率は95%以上であった。
2. この cytoplasm に B77-ASV を吸着、感染後、cytoplasm 内で新たに合成されて来る DNA を ^3H -チミジンでラベルすると、オートラジオグラフィ上に、photopositive grain が出現する。Mock infection を行なったコントロールの

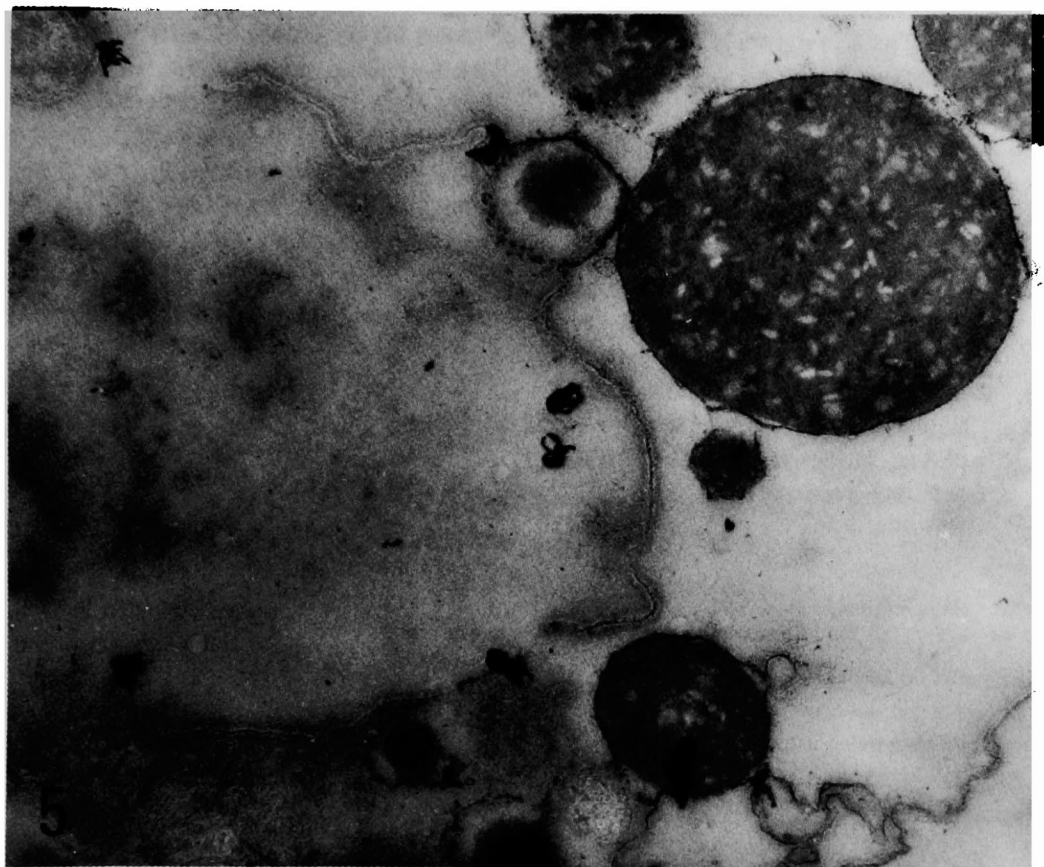
田中輝和論文附図



田 中 輝 和 論 文 附 図



田中輝和論文附図



- cytoplasm 内には, grain は見られない.
3. この B77 - ASV 感染 cytoplasm を固定後, RNase free DNase I で処理すると, photopositive grain は消失する.
 4. Cytoplasm に B77 - ASV を吸着, 感染後, 逆転写酵素の特異的阻害剤である N-demethyl rifampicin (AF/ AP) 400 μ g/ ml 存在下で incubate すると, cytoplasm 内 photopositive grain の出現が, ほぼ完全に阻止される.
 5. B77 - ASV 感染 cytoplasm を超薄切片とし, 電顕オートラジオグラフィを行なうと, photopositive grain は, ミトコンドリアとは無関係に, 細胞質の部位に出現する.
 6. 以上の実験事実より, B77 - ASV プロウイルス DNA は, 核の関与なく, 宿主 CEF 細胞質内で合成が開始されると考えられる.

謝 辞

本研究を遂行するにあたり, 終始, 御指導と御校閲を賜った恩師, 小田塚三教授に, 深甚の謝辞を捧げるとともに, 電子顕微鏡の技術の御教示をいただいた中村孝志技官, 組織培養において, 心からなる御協力をいただいた安井民枝女史, さらに, 多大の御援助をいただいた倉敷成人病センター附属癌研究所の方々, 殊に尾原広子嬢に, 深く感謝致します. また, AF/ AP を快く御恵与くださいました Gruppo Lepetit 社 (Milano, Italy) と, その仲介の労をとってくださいました Dow-Lepetit Japan 医学研究部長, 野島豊氏に, 心より御礼申し上げます.

文 献

- 1) Baltimore, D., *Nature*, **226** :1209, 1970.
- 2) Temin, H. M. and Mizutani, S., *Nature*, **226** :1211, 1970.
- 3) Spiegelman, S., Burny, A., Das, M. R., Keydar, J., Schlom, J., Travnicek, M. and Watson, K., *Nature*, **227** :563, 1970.
- 4) Hatanaka, M., Huebner, R. J. and Gilden, R. V., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **67** :143, 1970.
- 5) Green, M., Rokutanda, M., Fujinaga, K., Ray, R. K., Rokutanda, H. and Grugo, C., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **67** :385, 1970.
- 6) Rokutanda, M., Rokutanda, H., Green, M., Fujinaga, K., Ray, R. K. and Grugo, C., *Nature*, **227** :1026, 1970.
- 7) Fujinaga, K., Parsons, J. T., Beard, J., Beard, D. and Green, M., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **67** :1432, 1970.
- 8) Spiegelman, S., Burny, A., Das, M. R., Keydar, J., Schlom, J., Travnicek, M. and Watson, K., *Nature*, **227** :1029, 1970.
- 9) Mizutani, S., Boetiger, D. and Temin, H. M., *Nature*, **228** :424, 1970.
- 10) Hill, H. and Hillova, J., *Nature New Biol.*, **237** :35, 1972.
- 11) Hatanaka, M., Kakefuda, T., Gilden, R. V. and Callan, E. A. O., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **68** :1844, 1971.
- 12) Kakefuda, T., Dingman, C. W., Bak, T. M., Hatanaka, M. and Kitano, Y., *Can. Res.*, **34** :679, 1974.

- 13) Dales, S. and Hanafusa, H., *Virology*, **50** :440 , 1972.
- 14) Prescott, D. M., Myerson, D. and Wallace, J., *Exptl. Cell Res.*, **71** :480 , 1972.
- 15) Luft, J. H., *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9** :409 , 1961.
- 16) Varmus, H. E., Guntaka, R. V., Fan, W. J. W., Heasley, S. and Bishop, J. M., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **71** :3874, 1974.
- 17) Poste, G., *Exptl. Cell Res.*, **73** :273 , 1972.
- 18) Poste, G. and Reeve, P., *Exptl. Cell Res.*, **73** :287 , 1972.
- 19) Herrick, G., Spear, B. B. and Veomett, G., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **73** :1136, 1976.
- 20) Gurgo, C., Ray, R. K., Thiry, L. and Green, M., *Nature New Biol.*, **229** :111 , 1971.
- 21) Green, M., Bragdon, J. and Rankin, A., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **69** :1294, 1972.
- 22) Meilhac, M., Tysper, Z. and Chambon, P., *Eur. J. Biochem.*, **28** :291 , 1972.
- 23) Vesco, C. and Basilico, C., *Nature*, **229** :336 , 1971.
- 24) Furukawa, T., Sakuma, S. and Plotkin, S. A., *Nature*, **262** :414 , 1976.

図 附 説 明

- 図1. Mock infection を行なった. コントロール cytoplasm の光顕オートラジオグラフ 核の残った一部の細胞には, その核内に photopositive grain が密に見られる.
- 図2. B77-ASV 感染 cytoplasm の光顕オートラジオグラフ. コントロールには見られなかった photopositive grain が cytoplasm 内に diffuse に出現しているのが認められる.
- 図3. メタノール固定後, RNase free DNase I 処理を行なった, B77-ASV 感染 cytoplasm の光顕オートラジオグラフ. Cytoplasm 内の photopositive grain はほぼ完全に消失し, 核の残っていた細胞の核内 DNA は部分消化され, その photopositive grain の存在密度が減少している.
- 図4. B77-ASV 感染後, N-demethyl rifampicin (AF/AP) 存在下で incubate した cytoplasm の光顕オートラジオグラフ. Cytoplasm 内 photopositive grain の出現は, ほぼ完全に阻止されているが, 核内には, コントロールと同様, grain は密に存在している.
- 図5. B77-ASV 感染 cytoplasm の超薄切片電顕オートラジオグラフ. ほとんどの photopositive grain は, ミトコンドリアとは無関係に, 細胞質内に見られる. 右下のミトコンドリアと一致して photopositive grain が見られる.

**Autoradiographic studies on proviral DNA synthesis
in enucleated chick embryo fibroblasts
infected with avian sarcoma virus**

by

Terukazu TANAKA

Department of Biochemistry, Cancer Institute, Okayama University Medical School

(Director : Prof. Takuzo Oda)

After infection of RNA tumor viruses to susceptible cells, viral RNA is reversely transcribed into proviral DNA. In order to disclose the site of proviral DNA synthesis in the cells, chick embryo fibroblasts (CEF) were enucleated by centrifugation in the presence of cytochalasin B, and the enucleated CEF (cytoplasts) were infected with B77 strain of avian sarcoma virus (B77-ASV).

Incorporation of ^3H -thymidine into DNA in the cytoplasts was investigated by autoradiography. Photopositive grains were observed in cytoplasts infected with B77-ASV, but not in mock-infected cytoplasts.

The photopositive grains in the cytoplasts infected with B77-ASV disappeared almost completely by DNase I treatment. N-demethyl rifampicin, which is a specific inhibitor of reverse transcriptase, inhibited the appearance of photopositive grains.

The B77-ASV-infected cytoplasts were ultrathinsectioned for electron microscopic autoradiography. The photopositive grains appeared in the cytoplasm without relation to mitochondria.

These results indicate that the proviral DNA synthesis is initiated in the cytoplasm of B77-ASV-infected chick embryo fibroblast without the direct participation of nucleus.