

ウシ雄性生殖細胞におけるゴノサイトおよび精原幹細胞の同定

森 木 甲子郎¹、田津原 陽 平¹、谷 口 俊 仁^{1,2}、安 齋 政 幸³、
加 藤 博 己³、佐 伯 和 弘¹、入 谷 明³、三 谷 匡³

要 約

近年、マウスやラットにおいて精子形成を通して次世代の個体構築を担う唯一の幹細胞である精原幹細胞を体外で培養し、株化した生殖幹細胞 (Germline Stem Cell ; GS 細胞) が樹立された。しかし、ウシなどの食資源動物では ES 細胞や EG 細胞はいまだ樹立されておらず、高度な遺伝子改変を行う上で、代替えとなる幹細胞の樹立が望まれる。ウシ雄性生殖細胞の同定には、ヘマトキシリン・エオシン染色やレクチンの一種である DBA や c-kit を用いた組織学的解析やフローサイトメトリー (FCM) による解析が主に行われてきた。これにより、ウシ精巣内のゴノサイトや精原幹細胞や A 型精原細胞が、同定されてきた。

そこで本研究では、ウシにおけるゴノサイトおよび精原幹細胞の同定を目的として、RT-PCR ならびに *In situ* hybridization 法により、未分化マーカーとされている *Oct3/4* の mRNA の検出を試みた。さらに、ゴノサイトで発現している VASA タンパク質に注目し、月齢の異なるウシ精巣内、ならびに初代培養した *in vitro* でのゴノサイトの局在を免疫組織化学染色により同定した。その結果、ウシ *Oct3/4* は、RT-PCR において分化細胞からも検出され、さらに *In situ* hybridization においても、精細管内で特異的な発現は認められなかった。一方、VASA タンパク質は若齢ウシ精巣においてマウスと同様の発現パターンを示し、またウシ精巣細胞の初代培養においても VASA 陽性細胞の増殖が認められた。これらの結果から、ウシ若齢精巣において、VASA はゴノサイトや精原幹細胞で発現し、体外培養法の開発にも有効であることが示された。

緒 言

現在、様々な動物種において、精原幹細胞を体外培養する試みが行われている。しかし、マウスとラットにおいてのみ株化した生殖幹細胞 (Germline Stem Cell ; GS 細胞) が樹立されている^{1)~4), 8)~9)}。ウシにおいては、発生工学技術を用いるための幹細胞 (ES 細胞, EG 細胞) は、未だ樹立されていない。

ウシ精巣内における雄性生殖細胞の同定は、ヘマトキシリン・エオシン染色、レクチンの一種である *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA) や抗 c-kit 抗体を用いた組織学的解析、フローサイトメトリー (FCM) による解析などが行われてきた^{10)~13)}。こうした研究により、ウシ精巣内のゴノサイトや、精原幹細胞や A 型精原細胞を含む精原細胞の同定が報告されている。しかし、ウシでは DBA は精子細胞でも陽性反応を示す。ウシでは出生後 24 週齢以降の精細管内に精母細胞が出現し始め、出生後 32 週齢以降の精細管に精子が出現し始めることから、DBA は精子形成が進む出生後 30 週以内の限定された条件においてのみ、ウシ精巣におけるゴノサイトや精原細胞の特異的マーカーとして利用できる。

一方、c-kit は、マウスにおいて始原生殖細胞 (primordial germ cells, PGCs) で発現しているものの、ゴノサイトや精原幹細胞では発現が一旦消失し、A 型精原細胞や B 型精原細胞などの分化型精原細胞において再び発現し始める⁷⁾。動物種が異なるため、精子形成に要する時間はマウスとウシでは大きく異なるが、

1. 近畿大学生物理工学部 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. (財)わかやま産業振興財団 〒649-6261 和歌山県和歌山市小倉 60 和歌山県工業技術センター内

3. 近畿大学先端技術総合研究所 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1

精巣内における雄性生殖細胞の分化はマウスと同様の分化過程を経ていると考えられる。したがって、DBA や c-kit によるマウスやウシのゴノサイトや精原幹細胞の同定は十分ではないと考えられる。

さらに、マウスにおけるゴノサイトや精原幹細胞の膜表面分子マーカーの特徴として、Thy-1⁺, α 6-integrin⁺, CD9⁺, c-kit⁻であることが報告されている^{5)~7)}。しかし、マウスで有効とされている α 6-integrin および CD9 に対する抗体を用いて免疫組織化学的にウシ雄性生殖細胞であるゴノサイトや精原幹細胞の同定を試みたが、いずれも陽性細胞を検出することはできなかった(未発表データ)。そこで、マウス ES 細胞や生殖細胞などにおいて未分化マーカーとされている Octamer-binding protein である POU ドメインファミリーのひとつ *Oct3/4* 遺伝子に注目した。特に、本研究にあたり市販の抗 *Oct3/4* 抗体(Santa Cruz, sc-8628)を用いて、初代培養したウシ精巣細胞の免疫組織化学染色を行ったが、*Oct3/4* タンパク質の認識が困難であったことから、RT-PCR ならびに *In situ* hybridization を行い、ウシ *Oct3/4* 遺伝子の mRNA の発現について検討した^{18)~21)}。さらにマウスにおいて細胞質に局在する PGCs の初期分化マーカーである VASA タンパク質に注目した^{14)~16)}。細胞の同定には生細胞の分離を視野に細胞表面抗原タンパク質が望ましいが、これらの分子はいずれも細胞内に局在するタンパク質である。しかしながら、ウシゴノサイトや精原幹細胞の同定方法が確立しているとはいえない難い現在、精原幹細胞の体外培養系の開発などにも有効な情報となることから、本研究では、まず *Oct3/4* ならびに VASA によるウシゴノサイト、精原幹細胞の同定を試みた。

材料および方法

動物

本研究で用いるウシ精巣は、3日齢、3ヶ月齢、3.5ヶ月齢、5ヶ月齢のウシから去勢された精巣を用いた。

また、比較実験として用いた MCH (ICR) の新生仔の精巣は、MCH (ICR) (日本クレア (株)) の成熟した雄マウスと雌マウスを、自然交配させることによって得られた産仔から回収した。

なお、本実験に際して、実験の立案や実験動物に関わる取り扱いについては、近畿大学先端技術総合研究所動物実験の指針に準じて実施した。

凍結切片の作製

(I) *In situ* hybridization に用いた切片

去勢後、PBS (-) とエタノールを用いて洗浄したウシ精巣を 4% パラホルムアルデヒド溶液で前処理した。前処理後、12%, 15%, 18% のスクロース溶液で置換し、O.C.T. コンパウンド 凍結組織切片作製用包埋剤 (サクラファインテックジャパン: 45833) で包埋した。包埋後、ミクロトームを用いて、サンプルを 7 μ m に薄切し、MAS コート付スライドガラス (MATSUNAMI: KN3321876) に貼り付けた。

(II) 免疫組織化学染色に用いた切片

去勢後、PBS (-) とエタノールにより洗浄した一部のウシ精巣組織は、前処理とスクロース置換を行わずに、上記の方法 ((I) *In situ* hybridization) に従って包埋した。包埋後、サンプルは上記 ((I) *In situ* hybridization) と同様にサンプリングした。ただし、サンプルは 5 μ m で薄切した。

ウシ精巣細胞ならびにマウス精原幹細胞の体外培養

(I) 回収方法

ウシ精巣細胞は、去勢後洗浄したウシ精巣より精巣上体を取り除き、精巣鞘膜、白膜を切り開いて精細管を露出させた。Type I collagenase (SIGMA : C-0130) および 0.25% Trypsin (Invitrogen : 27250-018) 処理により細胞を解離した。細胞懸濁液はセルストレイナーなどを用いて濾過し、0.2%ゼラチン (SIGMA : G-1890) でコートしたディッシュ上で一晩培養後、浮遊細胞を回収することにより、接着性の体細胞を除去し生殖細胞の濃縮を行った。回収したウシ精巣細胞は、 7.1×10^5 /35mm ディッシュでウシのフィーダー細胞上に播種した。なお、比較実験で用いた ICR 系マウス由来精原幹細胞は、上記の方法 ((I) 回収方法) とほぼ同様に行い、細胞懸濁液を濾過後、マウスのゴノサイトならびに精原幹細胞の膜表面で特異的に発現している $\alpha 6$ -integrin を認識する抗体 (Purified anti-human CD49f (BD Bioscience : 555734)) を用いて磁気細胞分離システム (MACS) を用いて精原幹細胞を濃縮することにより調製した。MACS 処理後、マウス精巣細胞は、 2.0×10^5 /4-well plate でマウスフィーダー細胞上に播種した。

(II) 培養条件

ウシ精巣細胞およびマウス精原幹細胞の体外培養に用いた培養溶液は、StemPro34-SFM (Invitrogen : 10640-019) に 1% FBS, GDNF, bFGF, EGF, mLIF を添加し、その他のサプリメント溶液を添加して使用した^{1), 2)}。なお、培養は 37°C、5% CO₂ の気相下で行った。

本実験で用いたウシフィーダー細胞は、ウシ胎仔繊維芽細胞をマイトマイシン C (SIGMA : M4287) 処理したものを使用した。マウスフィーダー細胞は、12.5 日齢から回収したマウス胎仔繊維芽細胞をマイトマイシン C 処理したものを使用した。

RT-PCR

3.5 ヶ月齢のウシ精巣より調製した精巣細胞について、回収直後、1 週間培養、凍結融解したサンプルを準備し、それぞれ 5×10^5 cells /tube として細胞を調整した。さらに、ウシ卵子および成体由来ウシ繊維芽細胞 (5×10^5 cells) を調製した。これらのサンプルからの total RNA の抽出は、Micro Scale RNA Isolation Kit (Ambion : 1931) を用いて行った。逆転写反応は、SuperScript III Platinum Two-Step qRT-PCR Kit with SYBR Green (Invitrogen : 11735-032) を用いて行い、cDNA を合成した。RT-PCR は Taq DNA Polymerase (Qiagen : 201203) を用い、プロダクトシートにしたがい行った。RT-PCR に用いたプライマーは、参考文献¹⁷⁾に記載されている配列を用いた。



図 1. ウシ精巣内ならびに精巣細胞における *Oct3/4* mRNA の RT-PCR バンドサイズ : *Oct3/4* ; 314bp, *β -actin* ; 340bp

1. ウシ卵子
2. 成体由来ウシ繊維芽細胞
3. DW
4. ウシ 3.5 ヶ月齢 回収直後
5. ウシ 3.5 ヶ月齢 1 週間体外培養
6. ウシ 3.5 ヶ月齢 凍結融解

In situ hybridization

(I) プローブ作製

Oct3/4 に対するプローブは、ウシ卵子から作製した *Oct3/4* cDNA を用いて調製した。定法にしたがいプラスミド DNA を調製後、DIG RNA Labeling Kit (Roche : 11 175 025 910) を用いて RNA プローブを作製した。プローブ作製のために用いたプライマーは、参考文献¹⁷⁾を参照した。プローブの精製は DIG アプリケーションマニュアル for *In site* Hybridization (Roche) のプロトコールにしたがって行った。

(II) *In situ* hybridization

In situ hybridization 用に準備した凍結切片を PBS (-) で洗浄し、0.1% Triton X-100 (SIGMA : T-9284) を用いて賦活化処理を行った。次に、0.2N HCl を用いて塩基性タンパク質の除去を行い、Proteinase K (10 μ g/ μ l) 処理し、4% パラホルムアルデヒドで後固定した。その後、Ultrasensitive Hybridization Buffer (Ambion : Cat #8670) を用いてプレハイブリダイゼーションし、精製済みのプローブを 4 ng/ μ l になるように調整した後、ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、4 \times SSC、2 \times SSC で洗浄し、Blocking Reagent (Roche : 1 096 176) を用いてブロッキング処理を行った。次に、Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche : 11 093 274 910) を用いて抗体処理を行い、PBS (-) で洗浄後、発色反応を行った (NBT/BCIP ready-to-use tablets : 11 697 471 001)。発色反応後、エタノールによる脱色、グリセリンで再水和してから封入した。

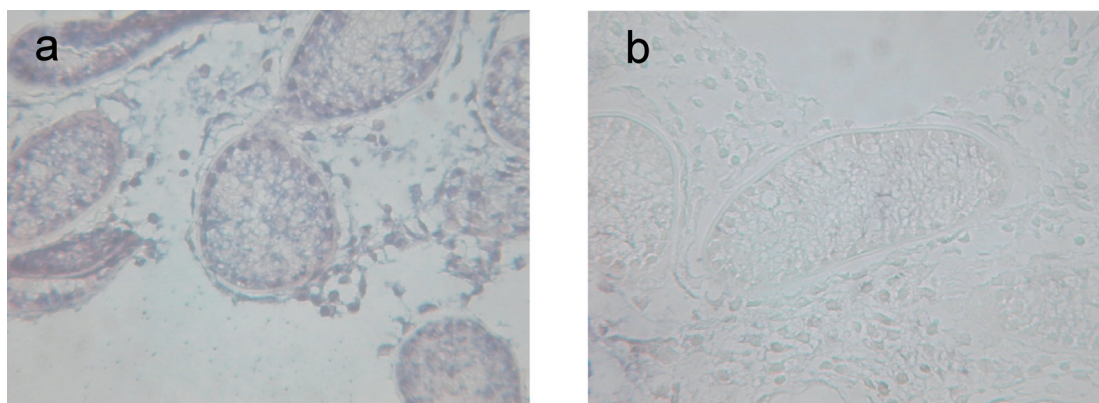


図 2. ウシ 3.5 ヶ月齢の精巣切片における *In situ* hybridization ($\times 400$)
プローブ濃度 : 4 ng/ μ l
(a) アンチセンス鎖
(b) センス鎖

免疫組織化学染色

(I) 凍結切片

3 日齢、3 ヶ月齢、5 ヶ月齢のウシ精巣切片を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、0.1% Triton X-100 (SIGMA : T-9284) を用いて賦活化処理を行った。1 次抗体には Rabbit polyclonal DDX4/MVH IgG, 1:500 (abcam : 13840) を、2 次抗体には Donkey anti-rabbit IgG-Rhodamine, 1:750 (Santa Cruz : sc-2095) を用いて染色を行った。抗体処理後、VECTASHILD with DAPI (Vector Laboratories : H-1200) で核染色と封入を行った。比較実験として、2 日齢の ICR 系マウス由来精巣切片を用い、上述と同様の操作により染色を行った。

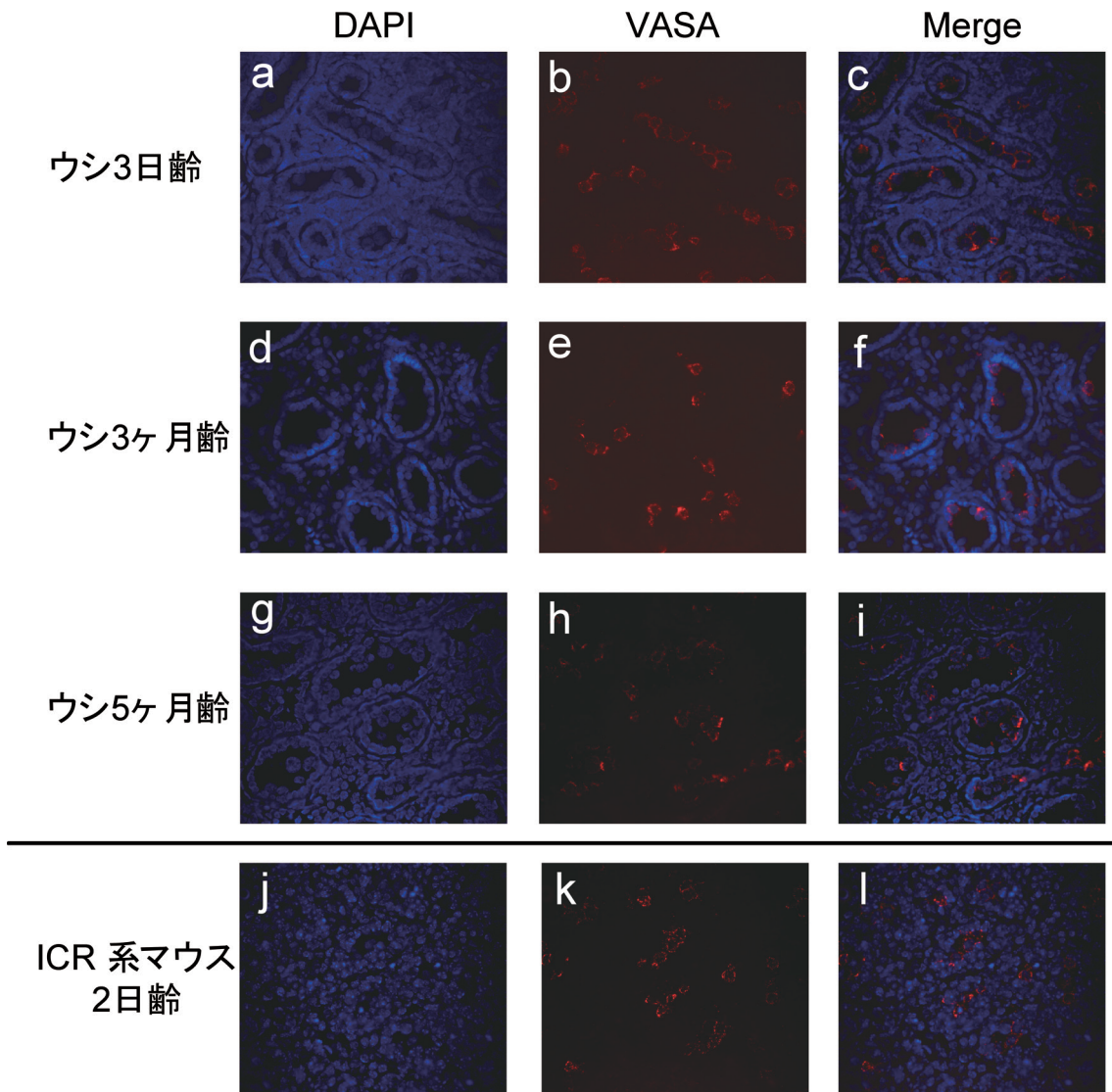


図3. ウシ精細管内ならびにマウス精細管内における免疫組織学的解析
(×400)

凍結切片を用いたウシ精細管内ならびにマウス精細管内における
VASAの免疫抗体染色を行った。

(a-c) ウシ3日齢、(d-f) ウシ3ヶ月齢、(g-i) ウシ5ヶ月齢、(j-l)
ICR系マウス2日齢。

(II) 培養細胞

5日間体外培養したウシ精巢細胞を、上記の方法((I)凍結切片)に従って染色した。

比較実験として、7日齢のICR系マウスから回収し、5日間体外培養した精原幹細胞を用いて、上記の方法((I)凍結切片)に従って染色した。CD9に対する免疫抗体染色法は、1次抗体に Biotin rat anti-mouse CD9 (BD Biosciences Pharmingen : 558749) を、2次抗体に Streptavidin-FITC (BD Biosciences Pharmingen : 554060) を使用した。

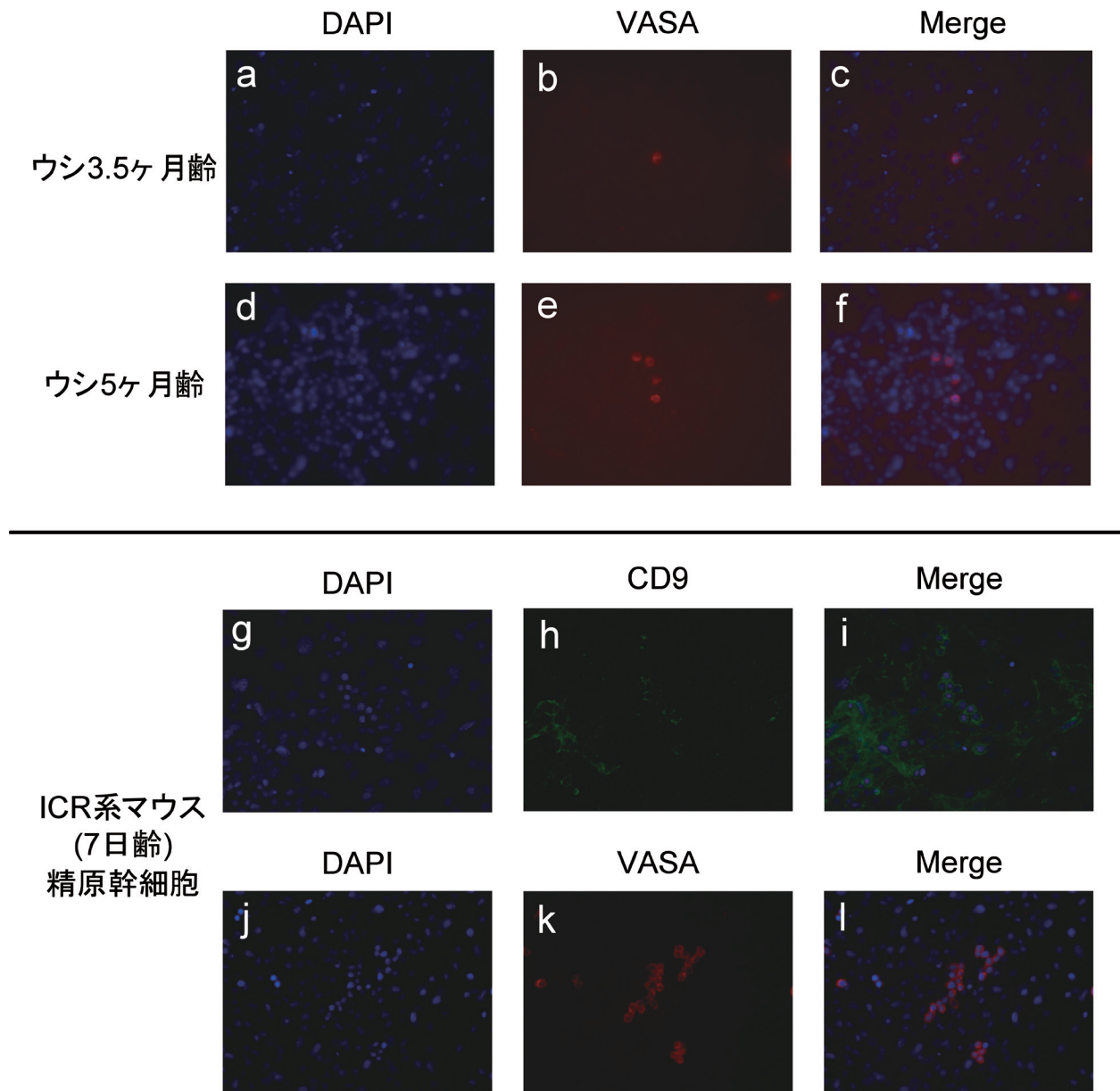


図4. 体外培養したウシ精巣細胞ならびにマウス精原幹細胞の免疫組織学的解析 (×200)

5日間体外培養したウシ精巣細胞において、VASAの免疫抗体染色を行った。比較実験として、5日間体外培養したマウス精原幹細胞において、VASAならびにCD9の免疫抗体染色を行った。

(a-c) ウシ3.5ヶ月齢、(d-f) ウシ5ヶ月齢、(g-l) ICR系マウス7日齢。

結 果

1. RT-PCR ならびに *In situ* hybridization によるウシ *Oct3/4* mRNA の局在

RT-PCRの結果、3.5ヶ月齢のウシ精巣より調製した精巣細胞の回収直後、1週間培養、凍結融解したサンプルにおいて、314bpの位置にバンドが確認されたため、ウシ精巣組織内ならびに培養細胞において、*Oct3/4* mRNAが発現していることが示された。しかしながら、ウシ卵子のみならず、成体由来ウシ繊維芽細胞においても*Oct3/4*の発現が認められた(図1)。一方、ウシ精巣組織について*In situ* hybridizationを行っ

た結果、*Oct3/4* センス鎖プローブによる非特異的染色は認められなかったものの、*Oct3/4* アンチセンス鎖プローブにおいて、基底膜付近の細胞が全体的に陽性の反応を示し、精細管内で *Oct3/4* mRNA が発現していることが示された (図 2)。

2. 免疫組織化学染色における VASA 陽性細胞の局在

ウシ精巣における免疫組織化学染色を行った結果、3 日齢、3 ヶ月齢、3.5 ヶ月齢、5 ヶ月齢、すべての精巣において、VASA 陽性細胞が観察された。また、VASA 陽性細胞は、月齢の経過とともに、精細管の中央付近から基底膜付近に移動していることが示された。比較実験として行った 2 日齢の ICR 系マウス由来精巣でも、精細管の中央付近にウシ精巣でみられるような VASA 抗体に対する陽性細胞が観察された (図 3)。

さらにウシ精巣細胞の体外培養における VASA 陽性細胞の存在について検討した。比較実験である 7 日齢 ICR 系マウス由来精巣細胞では、増殖している CD9 陽性の精原幹細胞コロニーにおいて細胞質中に VASA 陽性反応が観察された。そこで、5 日間培養したウシ精巣細胞について検討した結果、マウス精原幹細胞コロニーと同様の VASA タンパク質の局在を示す VASA 陽性ウシ精巣細胞が観察された (図 4)。ただし、コロニー形成には至らず 2～数個の細胞集団として存在し、増殖活性はマウスに比べかなり低いと考えられた。

考 察

RT-PCR の結果より、ウシ精巣内および精巣細胞に *Oct3/4* の mRNA が存在することを確認できた (図 1)。しかし、ウシ成体由来繊維芽細胞でも *Oct3/4* の mRNA が発現していたため、ウシ精巣内だけでなく、分化組織でも発現していると考えられる。また、*In situ* hybridization の結果より、基底膜付近の細胞が全体的に染色された (図 2)。これらの結果から、ウシにおいては *Oct3/4* のみによるゴノサイトや精原幹細胞の同定は、現状では困難であると考えられる。

免疫組織化学染色の結果より、3 日齢、3 ヶ月齢、5 ヶ月齢のウシ精巣において VASA タンパク質を発現する細胞の存在が初めて示された (図 3)。ウシの月齢が進むにつれて、VASA 陽性細胞は精細管の中央付近から基底膜へ向かって移動していることが観察された。マウスにおける PGCs は、着床直後 6.5 日胚 (E6.5) で胚の後方部位に出現し、10.5 日胚 (E10.5) までに尿膜と後腸を通過して生殖隆起へと増殖しながら移動する。生殖巣に辿り着いた PGCs は、オスではセルトリ細胞などの体細胞に囲まれ精細管が構築されていく。その後、PGCs から形態的にも変化し、特徴として大きな丸い円形の核を持つゴノサイトへと発達する。ゴノサイトは 2、3 日の間増殖し、その後一旦休止期に入るが、生後すぐに増殖を再開し、精細管の中央付近から基底膜に向かって移動する。そして、基底膜で精原幹細胞となり自己複製能力ならびに精子への分化能力を発揮する。本研究においても、若齢ウシ精巣にみられる VASA 陽性細胞は、形態学的特徴としてマウスゴノサイトの局在と同様に、精細管の中心付近あるいは基底膜付近に存在する円形の核を持った比較的大きな細胞であった。また、培養細胞においても、VASA 陽性細胞において分裂期の細胞像や数個の細胞からなるコロニーが観察されたことから、増殖過程にある精原幹細胞の存在が示唆された (図 4)。

これらの結果から、精子分化過程に至る精母細胞が精細管内に出現する以前の若齢ウシ精巣を用いることによる *Oct3/4* ならびに *Vasa* を併用したウシ精原幹細胞の同定は、精巣内でのゴノサイトや精原幹細胞の生物学的知見の獲得や精原幹細胞の体外培養系の確立に有効であると考えられる。

謝 辞

本研究の一部は、(独) 科学技術振興機構 和歌山県地域結集型共同研究事業アグリバイオインフォマティクスの高度活用技術の開発の研究助成により行われた。

参 考 文 献

1. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, Shinohara T. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol. Reprod.* 69: 612-616, 2003.
2. Ogawa T, Ohmura M, Tamura Y, Kita K, Ohbo K, Suda T, Kubota Y. Derivation and morphological characterization of mouse spermatogonial stem cell lines. *Arch. Histol. Cytol.* 67: 297-306, 2004.
3. Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, Baba S, Kato T, Kazuki Y, Toyokuni S, Toyoshima M, Niwa O, Mitsuo Oshimura, Heike T, Nakahata T, Ishino F, Ogura A, Shinohara T. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell.* 119: 1001-1012, 2004.
4. Ogawa T, Kita K, Kubota Y. Proliferation of spermatogonial stem cells and spermatogenesis in vitro. *Reprod. Medicine. Biol.* 5: 169-174, 2006.
5. Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. β_1 - and α_6 -integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Cell. Biol.* 96: 5504-5509, 1999.
6. Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Shinohara T. CD9 is a surface marker on mouse and rat male germline stem cells. *Biol. Reprod.* 70: 70-75, 2004.
7. Matzuk MM. Germ-line immortality. *PNAS.* 101: 16395-16396, 2004.
8. Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *PNAS* 101: 16489-16494, 2004.
9. Kubota H, Brinster RL. Technology insight: *in vitro* Culture of spermatogonial stem cells and their potential therapeutic uses. *Nature clinical practice* 2: 2006.
10. Izadyar F, den Ouden K, Creemers LB, Posthuma G, Parvinen M, de Rooij DG. Proliferation and differentiation of bovine type A spermatogonia during long-term culture. *Biol. Reprod.* 68: 272-281, 2003.
11. Izadyar F, Spierenberg GT, Creemers LB, den Ouden K, de Rooij DG. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *Reproduction* 124: 85-94, 2002.
12. Oatley JM, de Avila DM, Reeves JJ, Mclean DJ. Testis tissue explant culture supports survival and proliferation of bovine spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.* 70: 625-631, 2004.
13. de Rooij DG. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* 121: 347-354, 2001.
14. Noce T, Okamoto-Ito S, Tsunekawa N. Vasa homolog genes in mammalian germ cell development. *Cell Structure Function* 26: 131-136, 2001.
15. Sakai Y, Noce T, Yamashina S. Cleavage-like cell division and explosive increase in cell number of neonatal gonocytes. *Develop Growth Differ* 46: 15-21, 2004.
16. Toyooka Y, Tsunekawa N, Takahashi Y, Matsui Y, Satoh M, Noce T. Expression and intracellular

-
- localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell development. *Mechanisms of Development* 93: 139-149, 2000.
17. Kurosaka S, Eckardt S, McLaughlin KJ. Pluripotent lineage definition in bovine embryos by Oct4 transcript localization. *Biol. Reprod.* 71: 1578-1582, 2004.
 18. Ohmura M, Yoshida S, Ide Y, Nagamatsu G, Suda T, Ohbo K. Spatial analysis of germ stem cell development in Oct-4/EGFP transgenic mice. *Arch. Histol. Cytol.* 67: 285-296, 2004.
 19. Frankenberg S, Tisdall D, Selwood L. Identification of a homologue of POU5F1 (*Oct3/4*) in a marsupial, the brushtail possum. *Mol. Reprod. Dev.* 58: 255-261, 2001.
 20. Wang L, Duan E, Sung LY, Jeong BS, Yang X, Tian C. Generation and characterization of pluripotent stem cells from cloned bovine embryos. *Biol. Reprod.* 73: 149-155, 2005.
 21. Vejlsted M, Avery B, Schmidt M, Greve T, Alexopoulos N, Hyttel PM. Ultrastructural and immunohistochemical characterization of the bovine epiblast. *Biol. Reprod.* 72: 678-686, 2005.

英文要旨

Expression of stem and germ cell markers in juvenile bovine testis
and its primary cultureKo-shiro Moriki¹, Yohei Tazuhara¹, Shunji Taniguchi^{1,2}, Masayuki Anzai³,
Hiromi Kato³, Kazuhiro Saeki¹, Akira Iritani³, Tasuku Mitani³

Abstract

Recently, germline stem (GS) cells have been established from spermatogonial stem cells (SSCs) in mice (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2003). As neither ES cells nor EG cells have developed in food animals such as bovine and porcine, their GS cells may provide an alternative stem cell as a powerful tool for the highly-developed genetic manipulations. Bovine male germ cells have been characterized by histochemical analysis using a lectin of DBA and a c-kit receptor expression (Izadyar *et al.*, 2002). However, such cell population includes germ cells in various stages, not only stem cells but also more advanced spermatocytes. In this study, we focused on the expression of VASA, which is expressed from gonocytes to early meiotic stage in male germ cells, and *Oct3/4* to identify the stem cells in bovine juvenile testis and in primary culture of the testicular cells. Testes were collected from 3 days of post-partum (dpp) to 5-month (5-mo) old cattle. Testicular cells from 3.5-mo testis were prepared by digestion using 0.1% collagenase and 0.25% trypsin treatments. Dissociated cell suspensions were cultured on mitomycin C-treated bovine embryonic fibroblasts in StemPro34-SFM supplemented with 1%FBS, LIF, GDNF, bFGF, EGF and some other supplements at 37°C under 5%CO₂ in air. The expression of VASA was examined by immunohistochemistry and *Oct3/4* expression was examined by RT-PCR and *in situ* hybridization. In immunohistochemical analysis, VASA-positive cells were observed in the testes from 3-dpp to 5-mo old. Those cells had morphologically large nuclei and were detached from the basement membrane, which is characteristic to the gonocytes in juvenile testis. *In situ* hybridization analysis showed *Oct3/4* mRNA was detected in the cells placed under the basement membrane. Primary culture for 5 days showed the dividing cells positive for VASA, but their proliferation activity seemed to be quite low compared to the mouse spermatogonial stem cells. These findings indicate that the expression analysis combined VASA with *Oct3/4* may determine the population of bovine gonocytes and spermatogonia and would be useful to develop their culture conditions.

1. Department of Genetic Engineering, Kinki University, Kinokawa, 649-6493, Japan

2. Wakayama Industry Promotion Foundation, Wakayama, 649-6261, Japan

3. Institute of Advanced Technology, Kinki University, Kainan, 642-0017, Japan