

- 10) H. Abe, *J. Mamm. Ova Res.*, **24**, 70 (2007)
- 11) H. Abe, T. Otoi, S. Tachikawa *et al.*, *Anat. Embryol.*, **199**, 519 (1999)
- 12) H. Abe, S. Yamashita, T. Satoh, H. Hoshi, *Mol. Reprod. Dev.*, **61**, 57 (2002)
- 13) H. Abe, S. Matsuzaki, H. Hoshi, *Theriogenology*, **57**, 1273 (2002)
- 14) H. Abe, H. Shiku, M. Yokoo *et al.*, *J. Reprod. Dev.*, **52** (Suppl.), S55 (2006)
- 15) H. Shiku, Y. Torisawa, A. Takagi *et al.*, *Sens. Actuat. B*, **108**, 597 (2005)
- 16) T. Utsunomiya, K. Goto, M. Nasu *et al.*, *J. Mamm. Ova Res.*, **25**, 2 (2008)
- 17) R. Boni, A. Cuomo, E. Tosti, *Biol. Reprod.*, **66**, 836 (2002)
- 18) F. De Loos, P. Kastrop, P. van Maurik *et al.*, *Mol. Reprod. Dev.*, **28**, 255 (1991)
- 19) H. Aktas, M. B. Wheeler, N. L. First *et al.*, *J. Reprod. Fertil.*, **105**, 237 (1995)
- 20) P. Blandin, M. A. Sirard, *Mol. Reprod. Dev.*, **39**, 54 (1995)
- 21) N. L. Hazeleger, D. J. Hill, R. B. Stubbings *et al.*, *Theriogenology*, **43**, 509 (1995)

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
阿部宏之	胚の機能検定法	鈴木秋悦	カラーアトラス 不妊治療のための卵子学	医歯薬出版	東京	2010	127-131
阿部宏之	電気化学計測技術を応用したシングルセル呼吸機能解析と応用	神原秀記、松永是、植田充美	シングルセル解析の最前線	シーエムシー出版	東京	2010	103-111
珠玖 仁、伊野浩介、末永智一	単一細胞由来 mRNA 回収プロトコルの開	神原秀記、松永是、植田充美	シングルセル解析の最前線	シーエムシー出版	東京	2010	223-228
末永智一、高橋康史、伊野浩介、珠玖 仁	走査型電気化学顕微鏡による酵素イメージング	小宮山真	酵素利用技術体系-基礎・解析から改変・高機能化・産業利用まで-	株式会社エヌ・ティイー・エス	東京	2010年4月	112-116(5ページ) (第2編、第2節)

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sugimura S., Yokoo M., Yamanaka K., Kawahara M., Wakai T., Nagai T., <u>Abe H.</u> , Sato E.	Anomalous oxygen consumption in porcine somatic cell nuclear transfer embryos	<i>Cellular Reprogramming</i>	12 (4)	463-474	2010
Kimura N., Tsunoda T., Iuchi Y., <u>Abe H.</u> , Totsukawa K., Fujiii J.	Intrinsic oxidative stress causes either two-cell arrest or cell death depending on developing stages of the embryos from SOD1-deficient mice	<i>Molecular Human Reproduction</i>	16	441-451	2010
後藤香里、小池恵、熊迫陽子、宇津宮隆史、荒木康久、 <u>阿部宏之</u>	電気化学的呼吸計測技術におけるヒト胚クオリティー評価と安全性	受精着床学会雑誌	Vol. 27, No. 1	53-58	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sakagami N., Yamamoto T., Akiyama K., Nakazawa Y., Kojima N., Nishida K., Yokomizo S., Takagi Y., <u>Abe H.</u> , Suzuki C., Yoshioka K.	Viability of porcine embryos after vitrification using water-soluble pullulan films	<i>Journal of Reproduction and Development</i>	56 (2)	279-284	2010
Yamashiro H., Toyomizu M., Kikusato M., Toyama N., Sugimura S., Hoshino Y., <u>Abe H.</u> , Moisyadi S., Sato E.	Lactate and adenosine triphosphate in extender enhance the cryosurvival of rat epididymal sperm	<i>J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.</i>	Vol. 49	160-166	2010
Kurotani R., Okumura S., Matsubara T., Yokoyama U., Buckley J.R., Tomita T., Kezuka K., Nagano T., Esposito D., Taylor T.E., Gillette W.K., Ishikawa Y., <u>Abe H.</u> , Ward J.M., Kimura S.	Secretoglobin 3A2 suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis by TGFbeta signaling down-regulation	<i>Journal of Biological Chemistry</i>			2011 In press
横尾正樹、伊藤・佐々木隆広、珠玖仁、未永智一、 <u>阿部宏之</u>	呼吸活性を指標とした胚の品質評価 -マウス胚移植試験の成績と産子の正常性について	<i>産婦人科の実験</i>	59(9)	1375-1379	2010
後藤香里、小池恵、熊迫陽子、宇津宮隆史、 <u>阿部宏之</u>	選択的単一胚移植 (eSET) における移植胚選別困難例に対する呼吸量測定の有用性	<i>産婦人科の実験</i>	59(8)	1277-1281	2010
Nagamine K., Takahashi Y., Ino K., Shiku H., <u>Matsue T.</u>	Influence of tip size on single yeast cell imaging with scanning electrochemical microscopy	<i>Electroanalysis</i> ,	印刷中	印刷中	2011
Takahashi Y., Shevchuk A. I., Novak P., Murakami Y., Shiku H., Korchev Y. E., <u>Matsue T.</u>	Simultaneous non-contact topography and electrochemical imaging by SECM/SICM featuring ion current feedback regulation	<i>J. Am. Chem. Soc.</i>	132(29)	10118-10126	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shiku H., Okazaki D., Suzuki J., Takahashi Y., Murata T., Akita H., Harashima H., Ino K., <u>Matsue T.</u>	Quantitative characterization of reporter gene expression at single cell level with real-time RT-PCR, chemluminescence, fluorescence, and electrochemical imaging	<i>FEBS Lett.</i>	584	4000-4008	2010
Shiku H., Suzuki J., Murata T., Ino K., <u>Matsue T.</u>	Chronoamperometric characterization of secreted alkaline phosphatase from single cell entrapped in a poly(dimethylsiloxisane) microwell	<i>Electrochimica Acta</i>	55	8623-8627	2010
Lin Z., Ino K., Shiku H., <u>Matsue T.</u>	Electrochemical topography of a cell monolayer with an addressable microelectrode array	<i>Chem. Commun.</i>	46	559-561	2010
Lin Z., Ino K., Shiku H., <u>Matsue T.</u> , Chen G.	Addressable Electrochemiluminescence detection system based on redox-cycling of Ru(bpy) <sub>3</sub> <sup>2+</sup>	<i>Chem. Commun.</i>	46	243-245	2010
<u>Yoshino O.</u> , Hori M., Osuga Y., Hayashi T., Sadoshima Y., Tsuchiya H., Nishii O., Taketani Y.	Myomectomy reduces endometrial T2 relaxation times.	<i>Fertil Steril.</i>			2011
Wang B., Koga K., Osuga Y., Hirata T., Saito A., <u>Yoshino O.</u> , Hirota Y., Harada M., Takemura Y., Fujii T., Taketani Y.	High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Levels in the Placenta and in Serum in Preeclampsia	<i>Am. J. Reprod. Immunol.</i>		1-6	2011
Harada M., Osuga Y., Izumi G., Takamura M., Takamura Y., Hirata T., <u>Yoshino O.</u> , Koga K., Yano T., Taketani Y.	Dienogest, a new conservative strategy for extragenital endometriosis: a pilot study	<i>Gynecol. Endocrinology</i>		1-4	2010



発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hirata T., Osuga Y., Takamura M., Kodama A., Hirota Y., Koga K., <u>Yoshino O.</u> , Harada M., Takemura Y., Yano T., Taketani Y.	Recruitment of CCR6-expressing Th17 cells by CCL 20 secreted from IL-1 beta-, TNF-alpha-, and IL-17A-stimulated endometriotic stromal cells	<i>Endocrinology</i>	151(11)	5468-5476	2010
Shi J., <u>Yoshino O.</u> , Osuga Y., Koga K., Hirota Y., Nose E., Nishii O., Yano T., Taketani Y.	Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) Increases Gene Expression of FSH Receptor and Aromatase and Decreases Gene Expression of LH Receptor and StAR in Human Granulosa Cells	<i>Am J Reprod Immunol.</i>	65	421-427	2011
<u>Yoshino O.</u> , Hayashi T., Osuga Y., Orisaka M., Asada H., Okuda S., Hori M., Furuya M., Onuki H., Sadoshima Y., Hiroi H., Fujiwara T., Kotsuji F., Yoshimura Y., Nishii O., Taketani Y.	Decreased pregnancy rate is linked to abnormal uterine peristalsis caused by intramural fibroids	<i>Hum. Reprod.</i>	25(10)	2475-2479.	2010
Osuga Y., Koga K., Hirota Y., Hirata T., <u>Yoshino O.</u> , Taketani Y.	Lymphocytes in endometriosis	<i>Am. J. Reprod. Immunol.</i>	65(1)	1-10	2011
Hasegawa A., <u>Yoshino O.</u> , Osuga Y., Kodama A., Takamura M., Nishii O., Taketani Y.	Hyaluronic acid reagent suppressed endometriotic lesion formation in a mouse model	<i>Fertil Steril.</i>	93(8)	2757-2759	2010
吉野修、大須賀 穰	卵胞発育と血管新生	ホルモンフロンティア、メディカルレビュー社編	17(3)	227-235	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
藤本晃久	高齢化とART	日本産科婦人科学会誌	62(3)	754-760	2010
Taguchi A, Koga K, Osuga Y, <b>Fujimoto A</b> , Miyasaka A, Yano T, Kurokawa M, Taketani Y.	Successful management of a ruptured endometrial cyst in acute leukemia	<i>Fertil Steril.</i>	95(1)	292.e1-3	2011
Wada-Hiraike O., Osuga Y., Hiroi H., <b>Fujimoto A</b> , Maruyama M., Yano T., Taketani Y.	Sessile polyps and pedunculated polyps respond differently to oral contraceptives	<i>Gynecol. Endocrinol.</i>	27(5)	351-355	2010
Harada M., Hiroi H., Fujiwara T., <b>Fujimoto A</b> , Kikuchi A., Osuga Y., Momoeda M., Kugu K., Yano T., Taketani Y.	Case of chronic ectopic pregnancy diagnosed in which the complete shape of the fetus was visible by ultrasonography	<i>J. Obstet Gynaecol. Res.</i>	36(2)	462-465	2010
北麻里子、田口歩、堤亮、平池修、廣井久彦、 <b>藤本晃久</b> 、大須賀穰、矢野哲、武谷雄二	子宮動脈塞栓術後の子宮鏡手術で切除した胎盤ポリープの1例	日本産科婦人科学会東京地方部会誌	59(2)	284-287	2010
磯野涉、堤亮、砂川空広、廣井久彦、 <b>藤本晃久</b> 、大須賀穰、矢野哲、武谷雄二	帝王切開術後3ヵ月に大量性器出血をきたした子宮仮性動脈瘤破裂の1例	日本産科婦人科学会東京地方部会誌	59(1)	137-140	
山本直子、廣井久彦、大須賀穰、平田哲也、 <b>藤本晃久</b> 、矢野哲、武谷雄二	腹腔鏡用超音波プローブが有用であった卵管間質部妊娠	日産婦内視鏡学会	26(2)	274-377	2010
Yamada M., <b>Hamatani T</b> , Akutsu H., Chikazawa N., Kuji N., Yoshimura Y., Umezawa A.	Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein Hmgpi in early embryonic development	<i>Hum. Mol. Genet.</i>	19(3)	480-493	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Toyoda M., <u>Hamatani T.</u> , Okada H., Matsumoto K., Saito H., Umezawa A.	Defining cell identity by comprehensive gene expression profiling	<i>Curr. Med. Chem</i>	17(28)	3245-3252	2010
Tarin J.J., <u>Hamatani T.</u> , Cano A.	Acute stress may induce ovulation in women.	<i>Reprod Biol Endocrinol</i>	8:53		2010
<u>Hamatani T.</u>	Spermatozoal RNA profiling towards a clinical evaluation of sperm quality	<i>Reprod. BioMed. Online</i>	22(2)	103-105	2011
<u>Yokoo M.</u> , Kimura N., Sato E.	Induction of oocyte maturation by hyaluronan-CD44 interaction in pigs	<i>J. Reproduction and Development</i>	56(1)	15-19	2010
Sugimura S., Yamanaka K., Kawahara M., Wakai T., <u>Yokoo M.</u> , Sato E.	Early metaphase II oocytes treated with dibutyryl cyclic adenosine monophosphate provide suitable recipient cytoplasm for the production of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos	<i>Animal Science J.</i>	81	48-57	2010
Yamashiro H., Toyomizu M., Toyama N., Aono N., Sakurai M., Hiradate Y., <u>Yokoo M.</u> , Stefan M., Sato E.	Extracellular ATP and dibutyryl cAMP enhance the freezability rat epididymal sperm	<i>Journal of the American Association for Laboratory Animal Science</i>	49(2)	167-172	2010
横尾正樹、清水隆、 佐藤英明	細胞の流れ	日本哺乳動物 卵子学会編、 生命の誕生に 向けて(第二 版) - 生殖補 助医療(ART) 胚培養の理論 と実際		13-19	2011

### 3 単一細胞由来 mRNA 回収プローブの開発

珠玖 仁\*<sup>1</sup>, 伊野浩介\*<sup>2</sup>, 末永智一\*<sup>3</sup>

#### 3.1 はじめに

生体内において、神経系・免疫系など多様な細胞が共存する組織、発生段階や疾病進行・癌化の過程で異なる状態の細胞が共存する場合など、1細胞レベルでの遺伝子発現解析が有用となる。*In vitro*培養系でも、未分化細胞培養・分化誘導・共培養、遺伝子導入－ウイルス感染から形質変化までの工程など、いずれにおいても細胞の個性、形質のばらつきを遺伝子発現レベルで均一化することは技術的にも困難な状況にある。近年報告された興味深い研究<sup>1)</sup>によると、マウスの造血前駆細胞ではクローン集団であっても、ある幹細胞マーカータンパク質の発現レベルが3桁にわたるブロードな分布を示す。その不均一性は3週間以上培養しても維持される一方、発現レベルの異なる集団をソートすると数時間以内に分布のブロード化が始まる。しかしながら、ソートする以前の分布と一致するようになるまでには1週間以上かかるという。このように、細胞集団のレベルでは観測不可能であった現象が、1細胞解析により明らかになりつつある。

我々は、1細胞操作・計測のプラットフォームとして走査型プローブ顕微鏡 (SPM) システムを用い、探針として様々な多機能プローブ (ガラスキャピラリー、リング電極、流体プローブおよびそれらを複合化した探針) の微小化・高機能化を検討してきた。本節では、1細胞由来 mRNA 回収一定量プローブの開発について紹介する。本研究は、プローブ開発と探針一試料間距離制御機構<sup>2-4)</sup>に関わるこれまでの蓄積を活かしつつ、熟練を要するマイクロシステム (マイクロマニピュレータ、マイクロインジェクタ操作を含む) の刷新を目指して、操作性・精度の観点からの大幅な改良を目的とする。尚、原子間力顕微鏡 (AFM) システムによる遺伝子回収および遺伝子導入は、各々猪飼ら<sup>5)</sup> および中村ら<sup>6)</sup> による先駆的研究がある。

#### 3.2 リング電極プローブによる電場破砕法

1細胞由来の mRNA 定量解析を可能とする探針として、リング電極プローブを開発した<sup>7)</sup>。ガラスキャピラリーを Pt、パリレン C 絶縁層で被覆した。探針の先端は、当初は精密はさみで切り出し直径 10~20  $\mu\text{m}$  程度のリング電極を作製した。現在では集束イオンビーム (FIB) により直径 5  $\mu\text{m}$  以下のリング電極を高い歩留まりで (90% 以上) 量産することが可能となっている (図 1)。キャピラリー内壁をフッ化ヘキシルシラン処理により疎水化した。細胞培養基板として、コ

\* 1 Hitoshi Shiku 東北大学 大学院環境科学研究科 准教授

\* 2 Kosuke Ino 東北大学 大学院環境科学研究科 助教

\* 3 Tomokazu Matsue 東北大学 大学院環境科学研究科 教授

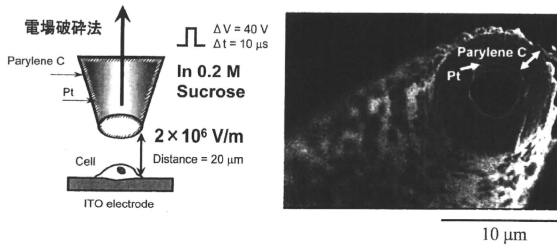


図1 リング電極プローブによる電場破砕法

ラゲコートしたIndium Tin Oxide (ITO) 電極を用いて細胞を播種、単層培養しておき、培地を0.2 Mスクロース溶液に置換した後、リング電極プローブを細胞の上方20  $\mu\text{m}$ に近接させて40 V, 10  $\mu\text{s}$ の電気パルスを印加し (ECM 2001 Electro Cell Manipulator, BTX-Harvard Apparatus), 細胞膜を瞬時に破砕した。同時にシリンジで探針内部に細胞内容物を吸引した。回収した細胞破砕液はDNaseとRNase Inhibitorを含むCell Lysis Bufferと混合し、逆転写反応 (RT), real-time PCRを実施して遺伝子発現量を定量した。この方法により、顕微鏡観察下狙った1細胞を電場破砕し、ほぼ100%の効率でmRNAを回収、定量解析することに成功した。目的遺伝子 ( $\beta 1$ -integrin) の相対発現量の違いから、細胞株の違い (例えば乳癌細胞MCF-7と乳腺細胞HMT-3522 T4-2) が1細胞レベルで判別可能であることが分かった。同様にしてマトリゲル上で培養した細胞塊 (スフェロイド) に電場を印加し、細胞塊の破砕回収、遺伝子発現解析を実施した。リング電極プローブによりマウス胚の内部細胞塊と栄養外胚葉から細胞を採取し、マーカー遺伝子により未分化状態を評価可能であることを確認した。さらに、発現レベルの異なる4種類のハウスキーピング遺伝子に着目し、回収法の違いにより遺伝子発現量に差があるかどうか検証した。図2にガラスキャピラリーおよびリング電極プローブにて1細胞から回収したmRNAの定量結果を示す<sup>9)</sup>。細胞には単層培養状態のMCF-7を使用し、遺伝子は文献<sup>9)</sup>を参考に、真核生物翻訳伸長因子1  $\gamma$  (EEFIG), コハク酸脱水素酵素複合体 (SDHA),  $\beta 2$ -ミクログロブリン (B2M), TATAボックス結合タンパク質 (TBP) を選んだ。各遺伝子において多細胞系の実験 ( $5 \times 10^4$  cells) から得られた値とほぼ同等の結果を得た。また、TBPのような10コピー/cell程度の低発現遺伝子を検出できた。以上より本手法を用いて細胞のmRNA解析が可能であることが示唆された。電場破砕による単一細胞分析は既にAllbrittonらの報告があるが<sup>10)</sup>、我々は初めてreal-time PCRを用いたmRNAの定量に成功し、電場破砕法によってmRNAの分解がほとんど起きないことを実証した。

#### 第4章 mRNAをターゲットとしたデジタル精密計測技術の開発

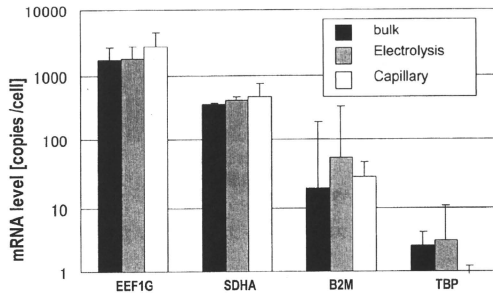


図2 ハウスキーピング遺伝子4種類の発現量を回収法の違いにより比較

### 3.3 マイクロ流体プローブによるmRNA定量解析

プローブ先端に、局所的層流を誘起して細胞破砕液を作用し、単層培養系から1細胞を回収した<sup>11)</sup>。マイクロ流体プローブ(MFP)は、ダブルパレルガラスキャピラリ管( $\theta$ 管)をキャピラリプレーで細尖化し、ダイヤモンドグラインダーで先端を切り出し用いた。内壁はフルオロシラン処理により核酸の吸着を防止した。注入シリンジから流速 $QI=40$  nL/minにてCell Lysis Bufferを導入すると同時に、吸引シリンジから $QA=360$  nL/minにて細胞破砕液を培地ごと吸引した(図3)。 $QA/QI=9.0$ の条件下では、プローブが試料近傍に配置されている場合に層流が形成され、導入したCell Lysis Bufferをすべて回収できることを確認した。しかしながら回収溶液のRNase Inhibitorの濃度が低下するため、mRNAの回収効率率は10%以下であった。単層培養系にてコンフルエントな状態に増殖した細胞に対し本法を適用すると、直径 $100\ \mu\text{m}$ の探針の場合、局所領域の細胞(11個)を回収できた。細胞播種密度が疎の状態では1細胞を回収可能であり、 $\beta 1$ -integrin相対発現量からMCF-7とHMT-3522の違いを判別することができた。MFPは元々Delamarcheらにより考案され<sup>12)</sup>、シリコンウェハに設けた $20\ \mu\text{m}$ 四方の貫通孔2個を導入口・吸引口とし、タンパク質パターンニングや細胞への色素導入などのデモンストレーションが行われた。その他にも近年では、液滴マイクロ流路の技術を組込んだプローブにより、土壌サンプルからの難培養性微生物の回収や、増殖能・グラム染色・fluorescence *in situ* hybridization (FISH)の並列分析などが報告されている<sup>13)</sup>。

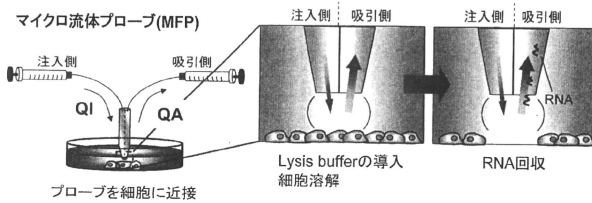


図3 マイクロ流体プローブによるmRNA定量解析

### 3.4 レポーターシステムにおけるmRNAとタンパク質の発現定量

大腸菌など単細胞バクテリアであっても、クローン集団が複数の安定状態を持ち得ることは比較的古くから知られていたが、1細胞レベルでの「ゆらぎ」の重要性が明らかになっていく過程で、GFPなどレポーター遺伝子とセルソーターの技術が大きな役割を果たした<sup>14,15)</sup>。Elowitzは波長の異なる2種類の蛍光タンパク質遺伝子を1コピーずつ大腸菌の染色体に導入し、1細胞ごとの発現活性の違いについて詳細な解析を試みた<sup>16)</sup>。その後、このような研究は酵母や哺乳動物細胞でも行われるようになっていく。

我々はレポーターシステムとしてGFP、分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP)、ルシフェラーゼ (Luc) 発現系を用い、mRNAとタンパク質双方のレベルでの発現量を評価してきた。まず、GFPを導入したHeLa細胞 (HeLa/pGFP) に発現するmRNAおよびタンパク質を、同一サンプルごとに定量し両者の相関性を評価した。蛍光顕微鏡観察時に蛍光強度によりタンパク質発現量を定量化した後、個々のアドレスの細胞に対しmRNA定量を行った<sup>8,17)</sup>。図4に、1細胞ごとのmRNAおよびタンパク質発現量の相関を示した。相関係数は遺伝子導入時のプラスミドDNA濃度を含む諸条件により影響を受けることが分かった。

SEAPを導入したHeLa細胞 (HeLa/pSEAP) の発現過程を電気化学的に評価した<sup>18)</sup>。酵素反応の基質としてp-アミノフェニルリン酸 (PAPP) を用い、脱リン酸化により生成するp-アミノフェノール (PAP) を電極電位+0.3 V vs Ag/AgCにて検出した (図5)。ITO電極上に絶縁膜SU-8を積層し直径30μmの1細胞ウェルアレイ (4×5) を作製した。誘電泳動により1細胞を捕捉し (捕捉率はほぼ100%) 1細胞ごとのSEAP発現を走査型電気化学顕微鏡 (SECM) により可視化した。次にNFκB経路のシグナル伝達を追跡するためにSEAP遺伝子の上流にκB応答配列を有するプラスミドを使用した (HeLa/pNFκB-SEAP)。当初SU-8ウェルアレイを使用していたがNFκB経路が応答してしまいバックグラウンドが上昇した。そこでウェルの材質をpoly (dimethylsiloxane) (PDMS) に変更したところ、サイトカインTNF-α刺激の有無に対する

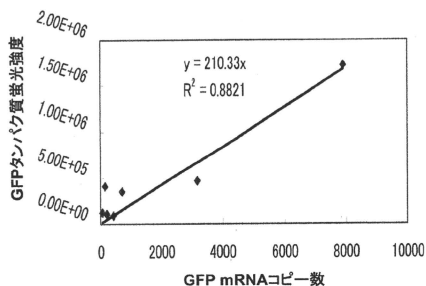


図4 HeLa/pGFPにおけるmRNAおよびタンパク質発現量の相関

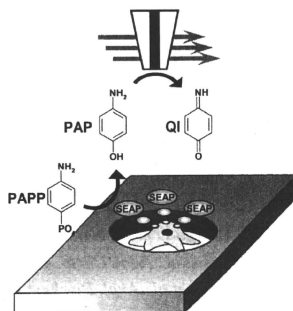


図5 SEAP発現過程の電気化学的評価法

1細胞応答に有意差を確認することができた。さらに、新規多点計測電気化学デバイスを作製した<sup>19)</sup>。本デバイスは1細胞ウェルアレイ(10×10)を交差バンド電極で挟む構造を持ち、各交点で起きるレドックスサイクルにより、100ポイントの計測を22秒で完了する。PAPの電極生成物であるp-キノイミン(QI)の還元電流を測定することによりバックグラウンド電流を抑え、1細胞由来の電流応答を観測することに成功した。Lucを安定に発現するHeLa-Luc細胞<sup>20)</sup>(北海道大学原島研究室秋田英万先生提供)と、リポフェクション法によりプラスミドベクターを導入後12時間の細胞(HeLa/pGL3-Luc)とでmRNAおよびタンパク質の発現量を比較した<sup>21)</sup>。mRNAおよびタンパク質の発現量はHeLa/pGL3-LucがHeLa-Lucよりも1桁大きい結果となった。また、1細胞ごとの発現量の分散はHeLa/pGL3-Lucのほうが大きくなることが示唆された。細胞集団から得られる情報は1細胞ごとの性質の平均を必ずしも反映していない。ある遺伝子の発現に注目してみると正規分布よりもむしろ対数正規分布に従うという実験事実が徐々に報告されるようになってきている。このことは、1細胞解析ツールのみならずデータの解釈、統計解析法から刷新されるべきであることを示唆している。

## 文 献

- 1) H. H. Chang *et al.*, *Nature*, 544 (2008)
- 2) Y. Takahashi *et al.*, *Langmuir*, 22, 10299 (2006)



- 3) Y. Takahashi *et al.*, *Anal. Chem.*, **81**, 9674 (2009)
- 4) 特願2009-140602「走査型電気化学イオンコンダクタンス顕微鏡測定法, 走査型電気化学イオンコンダクタンス顕微鏡, その探針および探針の製造方法」高橋康史ほか
- 5) H. Uehara *et al.*, *Ultramicroscopy*, **100**, 197 (2004)
- 6) I. Obataya *et al.*, *Nano Lett.*, **5**, 27 (2005)
- 7) Y. Nashimoto *et al.*, *Anal. Chem.*, **79**, 6823 (2007)
- 8) H. Shiku *et al.*, Proceedings of the Sixth International Forum on Post-genome Technologies (IFPT'6), p.261 (2009)
- 9) K. Taniguchi *et al.*, *Nature Methods*, **6**, 503 (2009)
- 10) F. Han *et al.*, *Anal. Chem.*, **75**, 3688 (2003)
- 11) H. Shiku *et al.*, *Anal. Biochem.*, **385**, 138 (2009)
- 12) D. Juncker *et al.*, *Nature Materials*, **4**, 622 (2005)
- 13) W. Liu *et al.*, *Lab Chip*, **9**, 2153 (2009)
- 14) 金子邦彦, 「生命とは何か」第2版, 東京大学出版会 (2009)
- 15) A. Raj *et al.*, *Cell*, **135**, 216 (2008)
- 16) M. B. Elowitz *et al.*, *Science*, **297**, 1183 (2002)
- 17) 岡崎大甫ほか, 第24回生体機能関連化学シンポジウム要旨集, 2C-04, p.88 (2009)
- 18) T. Murata *et al.*, *Biosens. Bioelectron.*, **25**, 913 (2009)
- 19) Z. Lin *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 2044 (2009)
- 20) T. Masuda *et al.*, *Biomaterials*, **29**, 709 (2008)
- 21) H. Shiku *et al.*, The 3<sup>rd</sup> International Workshop on Approaches to Single-Cell analysis, ETH Zurich, p.51 (2008)

## 第2節

走査型電気化学顕微鏡による  
酵素イメージング

## 1. 走査型電気化学顕微鏡 (SECM) とは

走査型電気化学顕微鏡 (scanning electrochemical microscopy; SECM) は走査型プローブ顕微鏡の一種である。SECM は、プローブとして微小電極 (ここではプローブ電極と称することにする) を用い、局所領域の電気化学反応種をファラデー電流として定量的にとらえることにより、位置分解能の高いピンポイント計測や2次元・3次元的イメージングが可能なシステムである。プローブ電極をバルク溶液中に設置し、電気化学反応種が十分に酸化あるいは還元される電極電位に保持すると、拡散律速に基づく以下の定常電流が得られる。

$$i_{tp}^{\infty} = 4nFDaC \quad (1)$$

$n$  反応電子数,  $F$   $9.65 \times 10^4$  (C/mol) ファラデー定数,  $D$  ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ) 拡散係数,  $a$  (cm) 電極半径,  $C$  ( $\text{mol}/\text{cm}^3$ ) 電気化学反応種濃度

一方、プローブ電極が測定対象基板の表面の近傍にある場合には、計測電流値は表面の性質に大きく影響される。SECM の計測には、フィードバック (FB) モードおよびジェネレーション/コレクション (G/C) モードがある。FB モードにおいて、プローブ電極を試料基板に近接させた場合、電極-基板間距離 ( $d$ ) が電極直径 ( $2a$ ) 以下 ( $d < 2a$ ) になると、観測される電流 ( $i_{tp}$ ) が急激に変化する。例えば、電気化学反応種を含む溶液中において、プローブ電極を金属基板に接近させると、電極-金属表面間における電気化学反応種のレドックスサイクリングが形成され観測電流が増加する (図 1(a))。これが、ポジティブ FB モードである。一方、プローブ電極を

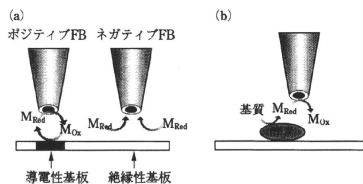


図 1 SECM による測定法  
(a) FB モード, (b) G/C モード

絶縁性基板に近接させた場合には、バルク溶液中から電極表面への電気化学反応種の供給が阻害されるため電流は減少する (図 1(a))。これが、ネガティブ FB モードである。

G/C モード計測では、基板表面等により生成される電気化学反応種をプローブ電極で捕捉する (図 1(b))。したがってこのモードを用いると、試料基板の表面における反応領域や電気化学反応種の生成速度を定量的に解析可能である。また、バルク溶液中に存在しない物質を計測する場合には、バックグラウンド電流を低減でき高感度分析が可能となる。

## 2. 酵素活性のイメージング

SECM は、局所領域に固定化された酵素活性評価のためのきわめて有効なツールである。固体基板表面に固定化されたさまざまな酵素の活性が SECM により測定されている。図 2 に、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) の酸化酵素であるジアフォラーゼ (Dp) がパターンニングされた

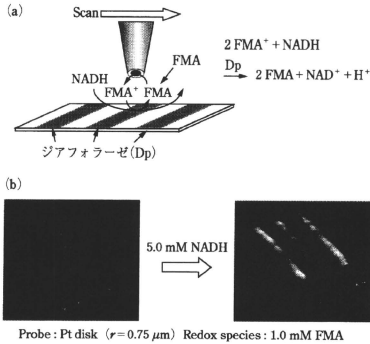


図2 固定化酵素イメージング

(a) 固定化した酵素(Dp)のイメージングの概要、(b) 基質であるNADHの添加前後のSECMイメージ

基板のSECMイメージを示した。この場合には、電気化学反応種(メディエータ)としてフェロセンメタノール(FMA)を用いている。酵素の基質であるNADHが溶液中に存在しない場合には、SECMイメージにはとくに特徴は認められないが、溶液中にNADHを添加すると、イメージにはラインアンドスペースのパターンが現れる。これは、プローブ電極表面で酸化され生成したFMA酸化物(FMA<sup>+</sup>)が、NADHが存在する場合には、酵素固定化領域でFMAに再生し、そのFMAが再び電極に酸化されるからである。このように、電極-酵素間においてメディエータのレドックスサイクリングが生じ電流応答は増幅される。プローブ電極がDp固定化領域の上方に移動してきた場合だけレドックスサイクリングによる電流増幅が起こるために、図2に示したようなイメージが得られる。このように、酵素が機能し触媒反応の進行を捕捉できることがSECMイメージングの大きな特徴の一つである。これは、ポジティブFBモード計測であるが、注意しなければならないのは、常に一定のバックグラウンドがあるということである。また、ポジティブFBモードを用いてパターンされた西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)やグルコースオキシダーゼの評価も行われている。

$\beta$ -ガラクトシダーゼ(Gal)やアルカリホスファターゼ(AP)の活性は、G/Cモード計測を用いて評

価できる。Galの基質である*p*-aminophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside(PAPG)は、基板表面に固定化されたGalにより加水分解され*p*-aminophenol(PAP)が生成する。生成したPAPは酸化されやすい物質であるため、プローブ電極を適切な電位に設定することによりPAPを検出できる。したがって、G/Cモード計測を行うことにより、局所領域のGal活性を捕捉することができる。APの場合には、基質として*p*-aminophenylphosphate(PAPP)を用いることにより、同様にイメージングすることが可能である(後述)。しかし、G/Cモード計測ではメディエータのレドックスサイクリングによる電流増幅ができないため高感度化が困難であった。Wittstokらは、2種類の酵素が固定化されたマイクロビーズを混合して固定化し、ポジティブFBモードとG/Cモードを融合させた高感度測定システムも報告されている。

SECMのプローブ電極上で進行する極微化学反応を利用すると局所的な反応場を構築し、表面改質を行うことが可能である。SECMによるマイクロファブリケーションでは、探針であるマイクロ・ナノ電極の酸化還元電位を制御することにより、さまざまな化学反応系が設計可能であるという特長がある。例えば、プローブ電極で発生させたHOラジカルなど反応活性種を利用することにより、試料表面の局所領域に化学反応を誘起し、酵素のパターンニングを行うことができる。

### 3. プロテインチップのイメージング

マイクロ・ナノ電極を用いた電流計測法は、一般に考えられているより高感度な計測法である。とくに、サンプル量を極微量とすることが可能なため、絶対量という観点では非常に高感度である。マイクロ・ナノ電極を用いて1 pAの電流を計測することは、ノイズ対策をしなければならないが、それほど困難なことではない。1 pAの電流は、測定対象物に換算すると $10^{-17}$  mol/sに相当し、かなり微量量といえる。酵素の化学増幅を利用した電流計測では、非常に高感度で酵素のセンシングが可能となる。例えば、酵素のターンオーバーを $10^5/\text{s}$ とすると、絶対量として $10^{-22}$  molと zmol( $10^{-21}$  mol)より下のレ

## 第2編 酵素を視る

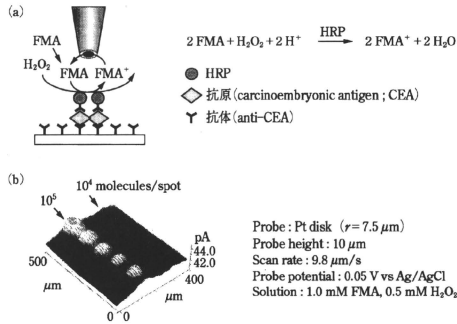


図3 SECMによるイムノアッセイシステム

(a) 標識酵素(HRP)のイメージングの概要, (b) イムノアッセイ後の HRP の SECM イメージ

ベルの酵素が電気化学的に計測できることになる。

したがって、マイクロ・ナノ電極をプローブとしたSECMと酵素免疫法を組み合わせることにより、高感度のイムノアッセイシステムが構築できる(図3)。

例えば、表面局所領域に異なる抗体を固定した基板(抗体チップ)上での、抗原-抗体反応を、高感度でSECMにより検出することが可能である。この場合、抗体チップに抗原(一般にタンパク質)を含む溶液を滴下すると、抗原はチップ上の特定抗体に捕捉される。その後、適当な酸化酵素(例えばペルオキシダーゼ)で標識された抗体で処理すると、この標識酵素をSECMによりイメージングできる。標識酵素が存在する場所には抗原が捕捉されているので、レスポンスが現れた場所から試料中に含まれるタンパク質の種類を特定できることになる。非常に低濃度の特定物質を検出・定量するためには、一般にその物質を濃縮する必要がある。抗体チップを用いると、微小領域に試料中の抗原を濃縮固定できるという特徴もあり、微細加工を施した基板の利用は、サンプル量の少量化や集積化という観点だけでなく、計測時間の短縮や検出感度の向上にも有効である。

また、酵素固定法を工夫することにより、抗体チップを用い100分子と超高感度でタンパク質を検出することが可能である。

## 4. 細胞が生産する酵素のリアルタイムイメージング

単一細胞で進行する化学反応プロセスを分析する技術は、細胞工学、遺伝子工学およびバイオチップデバイスの分野においてきわめて重要である。SECMは、光合成および呼吸のイメージングや定量的解析など、単一細胞レベルでの機能評価に用いられている。最近では、レポータータンパク質のイメージングにもSECMが用いられるようになってきている。

一般的に、レポータータンパク質として、緑色蛍光タンパク質(GFP)やルシフェラーゼ、分泌型アルカリホスファターゼ(SEAP)が用いられている。SEAPを用いたシステムでは、検出に蛍光基質や発光基質が用いられているが、PAPPを基質として用いた場合、SEAPによる加水分解でPAPが生成されるため、電極による検出が可能である(図4)。SECMを用いたアッセイは細胞に対して非侵襲であるため、SECMによるレポータータンパク質を介したリアルタイムな遺伝子発現の評価が可能になる。

SEAPを用いたレポータータンパク質のイメージングの概要を図5に示す。まず始めに、レポーター遺伝子を細胞に導入する。この遺伝子は、外部刺激からのシグナルで活性化した転写因子に応答する。その結果、転写・翻訳が行われ、SEAPが細胞外へ

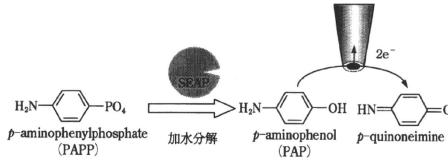


図4 細胞が生成するSEAPの電気化学測定  
PAPPはSEAPによりPAPに加水分解され、このPAPをプローブ電極で検出

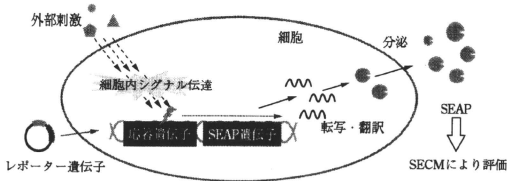


図5 SECMによるレポータータンパク質のイメージング

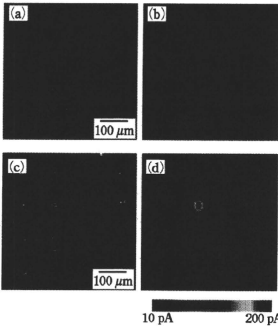


図6 SECMと微細ウエルを用いた単一細胞解析  
(a), (b)TNF- $\alpha$ なし, (c), (d)TNF- $\alpha$ (100 ng/ml), (a), (c)位相差顕微鏡写真, (b), (d)SECMイメージ

分泌される。このSEAPはG/Cモード計測で検出できるため、得られた電流値により、外部刺激に対する遺伝子発現の解析が可能になる。さらに、図6のように微細ウエルを用いた1細胞アレイを作製することで、ハイスループットな単一細胞の遺伝子機能の評価が行える。図6は、転写因子であるNF $\kappa$ Bに対する応答遺伝子が用いた結果を示しており、

TNF- $\alpha$ がNF $\kappa$ Bを活性化させる様子がイメージングされている。このように、SECMを用いた細胞が生産する酵素のイメージングにより、外部刺激に対する遺伝子機能の1細胞解析が可能になっていく。さらに、異なる応答遺伝子をもつ遺伝子を導入することで、網羅的な遺伝子解析への応用が期待されている。

## 5. SECMの解像度を上げるためには

SECMイメージングにおけるプローブ電極の走査法には、高さ一定モードと距離一定モードの二つの走査モードがある(FBモードとGCモードとは異なるので注意)。高さ一定モードは、プローブ電極先端を試料表面基板の上方で一定に保持し、高さ方向(Z方向)に位置フィードバックをかけない操作法である。距離一定モードは、基板表面(XY表面)上のサンプルの凹凸に応じてZ方向にフィードバックをかけ、試料-電極先端間の距離を一定とする走査法である。

高さ一定モードでのSECMイメージングでは、プローブ電極を単にXY方向に走査するだけであり

## 第2編 酵素を見る

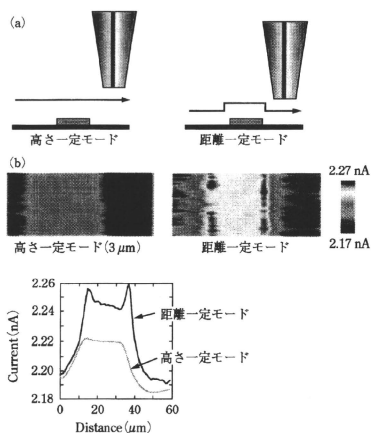


図7 高さ一定モードと距離一定モードにおける測定  
(a)プローブ電極の走査方法、(b)基板に固定化したDpのSECMイメージ

特殊な電極やフィードバック制御を行う必要がないため、計測操作が容易である。そのため、多くのSECMイメージングにはこのモードが採用されている。しかし、凹凸が多いサンプルでは正確にイメージングできない、イメージング範囲が広い場合には試料のわずかな傾斜の影響を受ける、等の問題点がある。

一方、距離一定モードでは、プローブ電極が基板に近接した際に働く電極-基板相互作用をフィードバック信号として利用し、電極-基板間距離を一定に保ちながら走査する。したがって、試料の形状情報を取得可能であり、また表面の電気化学的活性も同時に検出できる。この計測モードでは、プローブ先端-試料表面間距離を数十ナノメートル程度まで

で近接させることが可能であるため、解像度およびコントラストがきわめて高いイメージングが可能となる。距離一定モードでの高精度計測のためには、プローブ電極のさらなる微小化とナノメーター領域での距離制御機構の開発が必要となる。電極の微小化は容易ではないが、近年では、ナノードと呼ばれる数ナノメートルオーダーの微小電極が作製されている。ナノメートルレベルでの電極プローブ-試料間の距離フィードバック機構もいくつか提案されている。SECMで測定する酸化還元電流は数pAレベルであることも多いため、プローブ顕微鏡として汎用されているSTMのトンネル電流(通常、数十pA以上)を距離制御に用いることは現実的ではない。最近、AFMとSECMを組み合わせたシステム(AFM-SECM)が開発され、基板表面上にパターンされたグルコースオキシダーゼの活性が高精度でイメージングされた。しかし、探針の作製には精緻な加工技術を要することが問題点とされている。

我々は、試料と探針の間に働くシアーフォース(剪断応力)を音叉型水晶振動子(チューニングフォーク)によってモニターし、探針の高さをフィードバック制御することにより、試料-探針間距離を100 nm以下で一定に保ち、電気化学反応と表面形状を同時に観測できるシステムを作製し、バイオチップや固定化酵素の評価に適用した。図7にDpのラインパターンを高さ一定および距離一定モードでSECMイメージングした例を示した。シアーフォースフィードバックにより距離制御を行った場合にはイメージの解像度が大きく向上していることがわかる。また、このシステムを用いると、試料表面の形状のデータが同時に得られることも大きな特徴である。

<未永 智一/高橋 康史/  
伊野 浩介/珠玖 仁>

## Anomalous Oxygen Consumption in Porcine Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos

Satoshi Sugimura,<sup>1</sup> Masaki Yokoo,<sup>2</sup> Ken-ichi Yamanaka,<sup>3</sup> Manabu Kawahara,<sup>4</sup> Satoru Moriyasu,<sup>5</sup> Takuya Wakai,<sup>6</sup> Takashi Nagai,<sup>7</sup> Hiroyuki Abe,<sup>6</sup> and Eimei Satō<sup>1</sup>

### Abstract

Oxygen consumption reflects overall metabolic activity of mammalian embryos. We measured oxygen consumption in individual porcine somatic cell nuclear transfer (SCNT) and *in vitro*-fertilized (IVF) embryos by modified scanning electrochemical microscopy. Oxygen consumption in IVF embryos rapidly increased at day 5 of the blastocyst stage (D5BL). IVF embryos that consumed  $>0.81 \times 10^{14}$ /mol sec<sup>-1</sup> of oxygen at D5BL exhibited significantly higher hatching and hatched rates at D7BL, whereas D5BL SCNT embryos using porcine fetal fibroblasts did not show an increase in oxygen consumption until D7BL. The numbers of inner cell mass and trophectoderm (TE) cells and incidence of apoptosis did not significantly differ between IVF and SCNT embryos at D5BL. At D7BL, a significant lower number of TE cell and higher incidence of apoptosis were observed in SCNT than in IVF embryos; this significantly correlated with their oxygen consumption at D5BL. Use of cumulus cells as donor cells neutralized the low oxygen consumption in SCNT embryos at D5BL, regardless of the difference between the recipient cytoplasm and donor nucleus. Some of SCNT embryos at D7BL were retrieved the hatching completion and were improved the number of TE cell and apoptosis incidence by using cumulus cells. Thus, anomalous oxygen consumption in porcine SCNT embryos at D5BL could be sign of limited hatchability, which may be responsible for the low TE cell number and high apoptosis incidence.

### Introduction

RECENTLY, THE *IN VITRO* BLASTOCYST FORMATION RATE has improved by advances in somatic cell nuclear transfer (SCNT) techniques such as treatment of recipient cytoplasts (Beebe et al., 2007; Kawahara et al., 2005; Wakai et al., 2008) and donor cells (Mohan Kumar et al., 2006), *in vitro* culture conditioning (Im et al., 2004; Yamanaka et al., 2009), activation (Yamanaka et al., 2007), and diploid complement retention with cytochalasin treatment (Sugimura et al., 2008). Nevertheless, the efficiency of cloning after embryo transfer still remains very low. To explore the underlying cause of low cloning efficiency, previous studies have performed global gene expression analysis using differential screening and cDNA microarray in SCNT embryos; the results of these

studies revealed aberrant expression of genes associated with energy metabolism and mitochondrial function (Jincho et al., 2007; Vassena et al., 2007). Energy metabolism, including nutrient consumption, glycolysis, and oxidative phosphorylation, is crucial for cell proliferation and differentiation and embryo development and viability (Dumollard et al., 2007). Furthermore, in the *Xenopus* species, adenosine triphosphate (ATP)-dependent reactions have been suggested to affect the reprogramming of donor nuclei after SCNT (Kikyo et al., 2000). Thus, there have been some reports on physiological characteristics such as energy metabolism, including glucose uptake (Gao et al., 2003), glycolysis (Han et al., 2008), and ATP level (Boiani et al., 2004), in mouse SCNT embryos; however, energy metabolism in porcine SCNT embryos has not yet been elucidated.

<sup>1</sup>Laboratory of Animal Reproduction, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Sendai, Japan.

<sup>2</sup>Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Biosource Sciences, Akita Prefectural University, Akita, Japan.

<sup>3</sup>National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region, Kumamoto, Japan.

<sup>4</sup>Laboratory of Animal Resource Development Faculty of Agriculture, Saga University, Saga, Japan.

<sup>5</sup>Hokkaido Animal Research Center, Shintoku, Japan.

<sup>6</sup>Department of Veterinary and Animal Sciences, University of Massachusetts, Amherst, Massachusetts.

<sup>7</sup>National Institute of Livestock and Grassland Science, Tsukuba 305-0901, Japan.

<sup>8</sup>Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University, Yonezawa, Japan.

<sup>9</sup>Current address: National Livestock Breeding Center, Nishigo 961-8511, Japan.

In general, oxygen consumption is a good indicator of the overall metabolic activity of individual embryos because ATP is mostly generated by oxidative phosphorylation, a process in which oxygen plays a key role (Houghton et al., 1996; Leese, 2003; Thompson et al., 1996; Thompson, 2000; Trimarchi et al., 2000). Further, our previous studies have shown that oxygen consumption in individual *in vitro*-fertilized (IVF) bovine embryos directly correlated with the subsequent embryonic development (Abe and Hoshi, 2003; Shiku et al., 2001). These studies were performed using modified scanning electrochemical microscopy (SECM). The SECM system appears to be a reliable, noninvasive, and a highly sensitive method for the measurement of oxygen consumption in individual embryos (Shiku et al., 2001). In the present study, for a better understanding of the underlying cause of low cloning efficiency in pigs, we measured oxygen consumption by using SECM to evaluate energy metabolism in porcine SCNT embryos.

## Materials and Methods

### *In vitro* maturation of oocytes

Ovaries of prepubertal gilts from three-way crossing (Duroc boars × Landrace-Large White sows) were collected at a local slaughterhouse and transported to the laboratory within 2 h in a container containing warm saline. Porcine oocytes were aspirated from the antral follicles, 3 to 6 mm in diameter, using an 18-gauge needle attached to a 5-mL disposable syringe. Cumulus-oocyte complexes (COCs) with uniform ooplasm and compact cumulus cell mass were selected in modified Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) medium containing 5.56 mM glucose (Wako, Osaka, Japan), 0.33 mM sodium pyruvate (Wako), 1% (v/v) antibiotic antimycotic solution (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), and 4 mg/mL fatty acid-free bovine serum albumin (BSA; 128K7400, Sigma) (PB1) (Quinn et al., 1982). After washing in PB1, the COCs were cultured in BSA-free NCSU-23 medium (Miyoshi et al., 2000) for 44 h at 39 °C in a highly humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air. COCs were sequentially cultured as described by Funahashi et al. (1993). For the first 22 h of maturation culture, the medium was supplemented with 10 IU/mL equine Chorionic Gonadotropin (eCG; Serotropin; Teikokuzouki, Tokyo, Japan), 10 IU/mL human chorionic gonadotropin (hCG; Puberogen; Sankyo, Tokyo, Japan), 0.1 mg/mL cysteine (Sigma), 1 mM dibutylryl cyclic AMP (Sigma), and 10% (v/v) porcine follicular fluid. The culture for the subsequent 22 h was carried out in the same medium without eCG and hCG. After culturing, expanded cumulus cells of the COCs were removed by vortexing for 30 sec in PB1 containing 1 mg/mL hyaluronidase (Sigma), and the oocytes with the first polar body were selected as matured oocytes under a stereomicroscope, and they were transferred into PB1 and used for the experiments.

### Donor cells

The present study was approved by the Ethics Committee for Care and Use of Laboratory Animals for Biomedical Research of the Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University. Donor cells were isolated as described

by Wakai et al. (2008). In brief, pig fetuses of Goettingen breed (CSK, Suwa, Japan) were collected from the sow on day 56 of pregnancy. Each fetus was decapitated and eviscerated. The remaining tissues were washed in PBS (Sigma) and then digested with 0.1% (w/v) trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma) for 45 min at 38.5 °C. After digestion, the cells collected as porcine fetal fibroblast (pFF) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Sigma) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; A51408X, Gemini Bio-Products, Chalabasca, CA, USA). The culture medium was replaced every 2 days until the cells reached confluence. Subsequently, the cells were harvested with 0.1% (w/v) trypsin in PBS containing 0.5 mM EDTA for 5 min at 38.5 °C, frozen with a cryoprotectant (Cellbanker, Zenyaku, Tokyo, Japan) and stored in liquid nitrogen (passage 0). For an overall experiment, fetal fibroblasts derived from one female Goettingen breed were used (Wakai et al., 2008). However, in the only experiment for evaluating potential sex specific effects (Supplementary Table 1; see online supplementary material at [www.liebertonline.com](http://www.liebertonline.com)); we used male fetal fibroblasts from littermates with this female fetal fibroblasts. Prior to the start of experiments, the cells were thawed and cultured in DMEM plus 10% FBS and used between passages 4 and 9. The fibroblasts were cultured for 1 week after they had attained confluence and were then used as donor cells. As another type of donor cell to use, the porcine cumulus cells (pCC) were prepared. After *in vitro* culture of COCs for 44 h, cumulus cells were isolated from oocytes by pipetting in PB1 containing hyaluronidase. Then they were transferred to PB1 for use as donor cells. They were injected to enucleated oocytes either from the same female (pCC-Auto) or from a different female (pCC-Allo).

Through the experiments, donor cells were used pFF. We further used pCC in Experiments 6 and 7.

### Nuclear transfer

We produced the SCNT embryos by the reconstruction of enucleated oocytes with somatic cells in accordance with previous work, in which we had already confirmed the reconstructed embryos to be survivable until adult nuclear transplant miniature pigs (Wakai et al., 2008). The cumulus-free oocytes were stained with 5 µg/mL Hoechst 33342 (Sigma) for 5 to 10 min at 39 °C and transferred into PB1 containing 2.5 µg/mL cytochalasin D (Sigma). Enucleation was performed by aspirating the first polar body and a small volume of the adjacent cytoplasm with an enucleation pipette of 20 µm diameter using a piezo-driven unit (Primatech, Tokyo, Japan), and its success was confirmed by visualizing the presence of metaphase plates within the removed cytoplasm under ultraviolet (UV) light. The enucleated oocytes were washed three times with porcine zygote medium-3 (PZM-3) (Yoshioka et al., 2002) and transferred to a 100-µL droplet of PZM-3 for the subsequent microinjection or fusion of the donor nucleus. The donor cells were transferred to a 50-µL droplet of PB1. To produce SCNT embryos by microinjection of donor cells, their plasma membranes were broken by gently aspirating them in and out of the injection pipette of 10 µm in diameter before microinjection into cytoplasm. To produce SCNT embryos by the electric fusion, intact donor cells were