

## ミューラー行列を用いた蛍光偏光イメージング法

後藤 晃・大場 哲彦\*・大木 和夫

## Fluorescence Polarization Imaging Using Mueller Matrix Formulation

Akira GOTO, Tetsuhiko OHBA and Kazuo OHKI

Some problems with relation to polarization measurements on a fluorescence microscope were discussed. A new method using the Mueller matrix formulation has been developed; in this formulation the polarization states of light were described by Stokes vectors and the transformation between two polarization states was described by the Mueller matrix. Once the Mueller matrix images of a fluorescent sample were measured, not only fluorescence anisotropy but also average orientation of transition dipoles could be calculated straightforward.

**Key words:** fluorescence anisotropy, polarization imaging, Stokes vector, Mueller matrix, orientation of transition dipole

偏光励起した蛍光色素の発光の偏光解消度を測定する実験手法（蛍光異方性）は、蛍光色素をラベルした蛋白質の回転拡散速度を調べたり、色素の置かれた微視的な粘性を得るために広く用いられている<sup>1)</sup>。通常の測定では、蛍光分光器の励起側と発光側に偏光子を入れて、縦偏光励起に対する縦偏光発光強度 ( $I_{VV}$ ) と横偏光発光強度 ( $I_{VH}$ ) を用いて、蛍光異方性は、

$$r = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + 2I_{VH}} \quad (1)$$

と定義される。試料が不均一な場合（例えば、粘性の高い領域と低い領域が混在しているような場合）には、それらの平均値が観測される。

細胞を構成する膜は、その構成成分は著しく不均一で、その柔らかさ（膜流動性）も、形質膜とオルガネラ膜では大きく異なっている。これらの膜流動性の不均一性を調べることを目的に、蛍光顕微鏡下で蛍光異方性の測定を行うと、分光器を用いた巨視的な測定では現れなかった問題に直面する。本稿では、まず、顕微鏡下での蛍光偏光測定に現れる問題について述べた後に、最近、筆者らが開発したミューラー行列を用いた方法<sup>2)</sup>を紹介する。

## 1. 顕微鏡下での蛍光偏光測定の諸問題

図1に、蛍光異方性を観測する測定系の概念図を示す。

顕微鏡下の測定での第1の問題は、膜に溶け込んだ色素のように、微視的に色素が配向している場合である。蛍光分光器を用いた巨視的な測定系では、微視的には色素が配向していても、観測領域全体としては等方的であれば、2回の測定で式(1)から、色素の回転拡散速度を反映する蛍光異方性の値が得られる。一方、微視的な測定で色素が配向している場合(図2)は、平行と垂直の測定だけから蛍光異方性を計算すると、結果に励起方位依存性が現れる。顕微鏡下でのこの問題を克服するため、いくつかのアプローチが行われてきたが<sup>3,4)</sup>、一般的な解決はなされていない。

落射蛍光顕微鏡型の測定系のもうひとつの問題は、巨視的な測定系のように、偏光子と検光子を試料の直前と直後に置けない点である。特に、ダイクロイックミラーは、 $0^\circ$ と $90^\circ$ 以外の偏光入射に対しては、透過光と反射光の偏光特性を変える。この効果を正しく取り入れないと、蛍光試料による偏光解消を取り出すことができない。もちろん、分光器による巨視的な測定でも分光器自体の偏光特性は補正する必要はあるが、顕微鏡での測定系の場合、偏光子と検光子の間にも試料以外の偏光を変える素子が存在する点と、あらゆる偏光方向への特性を考慮することが必要な点で、はるかに複雑である。

このような蛍光顕微鏡下での偏光測定の問題に対し、筆

東北大学大学院理学研究科 (〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉) \*E-mail: chba@bio.phys.tohoku.ac.jp

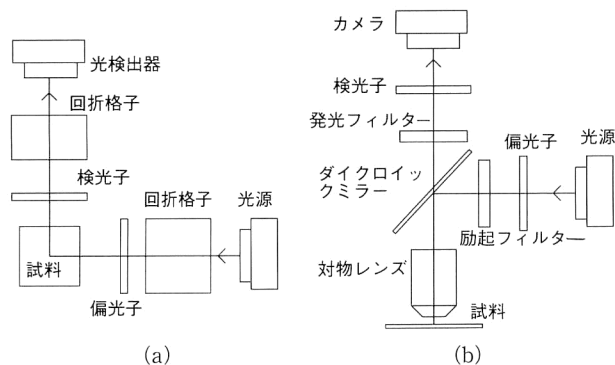


図1 蛍光異方性の測定系の概念図。(a) 蛍光分光器での巨視的測定系、(b) 落射蛍光顕微鏡での微視的測定系。

者らは、光源からカメラに至るまでの偏光の変化を一般的に取り扱い、その過程で蛍光試料の偏光応答を取り出すという方法論を選択した。

## 2. ストークスペクトル-ミューラー行列による偏光の記述

励起状態の蛍光色素からの光子の放出は、蛍光寿命に従って確率的に起き、またその発光波長も幅広であることから、蛍光発光は本質的にインコヒーレントであり、その偏光状態は部分的に偏光している。蛍光現象による偏光の変化を記述するための表現法には、部分的に偏光した状態を記述できるとともに、偏光状態から無偏光状態への変換を記述できることが必要である。偏光状態の記述法を表1にまとめた<sup>5,6)</sup>。電場表示は、完全偏光状態しか記述できない。コヒーレンス行列は、部分的に偏光した状態まで含むすべての偏光状態を記述可能であるが、 $2 \times 2$  行列の表現形態から、偏光した状態から無偏光の状態への変換ができない。ストークスペクトル自体はコヒーレンス行列と等価であるが、その変換を表す  $4 \times 4$  のミューラー行列は、あらゆる偏光状態の変換が可能である。以上から、蛍光現象による偏光の変化を一般的に記述するために、ストークスペクトル-ミューラー行列の方法を用いることにした。

## 3. ミューラー行列の測定

光の偏光状態をストークスペクトルで、偏光を変化させ

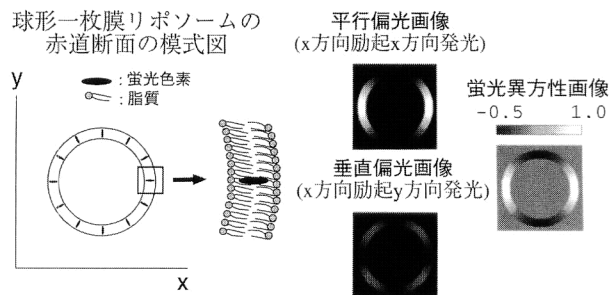


図2 微視的に配向している色素の蛍光異方性。

る素子をミューラー行列で記述することで、落射型蛍光顕微鏡 (図1(b)) での偏光状態の変化は、

$$S_{\text{obs}} = M_{\text{EMPOI}} M_{\text{DMT}} M_{\text{Obj}} M_{\text{Sample}} M_{\text{Obj}} M_{\text{DMR}} M_{\text{EXPOI}} S_{\text{lamp}} \quad (2)$$

と書くことができる。  $S_{\text{lamp}}$  は光源のストークスペクトルで、光の進行にしたがって現れる光学素子のミューラー行列を右から順に書いた。  $S_{\text{obs}}$  の第1要素が最終的に観測される光の強度を表す。試料以外のミューラー行列をあらかじめ測定しておけば、偏光子と検光子の種々の組み合わせで蛍光画像を測定することで、試料のミューラー行列を決定することができる。  $4 \times 4$  のミューラー行列の要素をすべて決めるためには、最低、16組の組み合わせについて測定する必要がある。

ストークスペクトルの第4成分は円偏光性を表し、ミューラー行列の第4行および第4列は、円偏光成分からの変換を表す。蛍光現象では、吸収や発光に関与する光子同士の位相情報がまったく保存されないため、円偏光と自然光の区別がつかない。そこで、  $4 \times 4$  のミューラー行列の第4行と第4列を無視して  $3 \times 3$  の形で取り扱っても構わない。この場合には、ミューラー行列の  $3 \times 3$  要素を決めるために、最低、9回の測定が必要である。本研究では、偏光子と検光子のそれぞれについて、  $\{0^\circ, 60^\circ, 120^\circ\}$  の直線偏光子を用いた。

図3(a) に、DPPC リポソームにペリレンという色素を

表1 偏光の各種表現法。

名称	電場表示	コヒーレンス行列 ( $J$ )	ストークスペクトル ( $S$ )
定義	$E = (E_x \ E_y)$ $E_x(t) = a_x e^{i(\phi_x - 2\pi\nu t)}$ $E_y(t) = a_y e^{i(\phi_y - 2\pi\nu t)}$	$J = \begin{pmatrix} \langle E_x E_x^* \rangle & \langle E_x E_y^* \rangle \\ \langle E_y E_x^* \rangle & \langle E_y E_y^* \rangle \end{pmatrix}$ $E_x(t) = a_x(t) e^{i(\phi_x(t) - 2\pi\nu t)}$ $E_y(t) = a_y(t) e^{i(\phi_y(t) - 2\pi\nu t)}$ $\langle \dots \rangle$ は時間平均を表す。	$S = (S_0 \ S_1 \ S_2 \ S_3)$ $S_0 = \langle E_x E_x^* \rangle + \langle E_y E_y^* \rangle$ $S_1 = \langle E_x E_x^* \rangle - \langle E_y E_y^* \rangle$ $S_2 = \langle E_x E_y^* \rangle + \langle E_y E_x^* \rangle$ $S_3 = i(\langle E_x E_y^* \rangle - \langle E_y E_x^* \rangle)$
偏光の変換	$E' = TE$ $T$ : Jones 行列 ( $2 \times 2$ )	$J' = T J T^\dagger$	$S' = MS$ $M$ : ミューラー行列 ( $4 \times 4$ )
表現能力	完全偏光しか記述できない	部分偏光も記述可能 偏光から無偏光への変換不可	部分偏光も記述可能 偏光から無偏光への変換可能

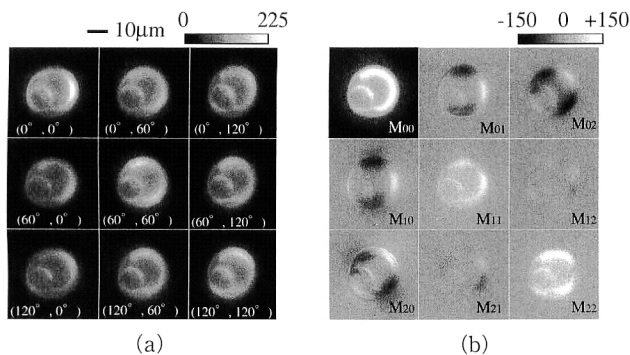


図3 DPPC中のペリレンの蛍光偏光画像 (a) とミュラー行列画像 (b)。

入れて撮影した偏光蛍光画像を示す。式(2)の試料以外の光学素子のミュラー行列を透過型や反射型の分光光度計などで測定し、それらの値を使って、図3(a)の画像から算出したミュラー行列画像が図3(b)である。ミュラー行列の対角項は、偏光方位に依存しない等方的な偏光応答を表し、非対角項は偏光方位に依存する異方的な偏光応答を表している。

#### 4. 色素の配向と蛍光異方性

ミュラー行列画像(図3(b))は、蛍光試料の偏光応答についてのすべての情報を含んでいる。例えば、励起方向に依存しない蛍光異方性(巨視的な測定での蛍光異方性と同等)は、あらゆる励起光の偏光方向に対する平行と垂直の画像を平均化したものとして解析的に計算できる。また、色素の遷移双極子モーメントの平均方向は、自然光で励起した場合の発光の偏光方向である。図3(b)のミュラー画像を用いて計算したDPPC中のペリレンの蛍光異方性と平均配向を図4に示す。ペリレン分子の遷移双極子は、平均的には膜に垂直に向いていることがわかる。蛍光異方性のリポソーム全体での平均値は $0.12 \pm 0.01$ で、蛍光分光器で測定した巨視的な値( $0.09 \pm 0.01$ )とほぼ一致している。

以上述べてきたように、蛍光顕微鏡下での偏光の変化をミュラー行列で一般的に記述することで、装置による偏光の歪みも定量的に除くことができ、色素の平均配向方向、回転拡散の速さ(蛍光異方性)などを同時に得ることができる。この方法を、蛍光色素を用いて膜の柔らかさを画像

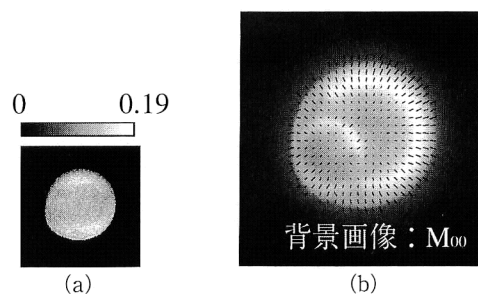


図4 DPPC中のペリレンの蛍光異方性画像 (a) と色素の平均配向方向 (b)。

化する他の方法<sup>7,8)</sup>と比較すると、(1)色素の運動性と配向が同時に得られる、(2)任意の色素に適用可能、という利点があり、細胞内に発現させたGFP (green fluorescent protein)<sup>†</sup>など、広い応用が考えられる。

本稿では、蛍光現象の性質から、円偏光を無偏光と等価に扱う近似を用いたが、試料に複屈折性がある場合にはそこで直線偏光と円偏光の変換が起こるため、測定される偏光解消にその影響が現れる。巨視的な測定系の場合にも、蛍光異方性というパラメーターには、色素の回転拡散と試料の複屈折性によるものが両方含まれる。ペリレンの蛍光異方性の実測値における巨視的測定と微視的測定とのわずかな差は、巨視的測定のほうが複屈折の影響が大きく現われるためであると考えている。これらを分離して、2つの情報を同時に取り出す方法について、ミュラー行列測定の4×4への拡張を含めて現在検討している。

#### 文 献

- 1) J. R. Lakowicz: *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Plenum Press, New York, 1983) pp. 111-153.
- 2) A. Goto, T. Ohba and K. Ohki: *4th International Conference on Biological Physics* (Kyoto, 2001) p. 33.
- 3) K. Fushimi, J. A. Dix and A. S. Verkman: *Biophys. J.*, **57** (1990) 241-254.
- 4) K. F. Casteel: *Biophys. J.*, **57** (1990) 947-954.
- 5) M. Born and E. Wolf: *Principles of Optics*, 6th ed. (Pergamon Press, New York, 1980) pp. 544-555.
- 6) K. Kim: *J. Opt. Soc. Am.*, **4** (1986) 433-437.
- 7) T. Ohba, T. Kiuchi, Y. Kamakura, A. Goto, T. Kumeta and K. Ohki: *J. Biosci.*, **24** (1999) S117.
- 8) 大場哲彦: “環境感受性色素によるリポソームと細胞の膜物性のイメージング”, *膜*, **23** (1998) 196-203.

(2002年1月28日受理)

<sup>†</sup>GFP遺伝子を細胞内に導入して、特定の蛋白質に蛍光性をもたせることが可能で、遺伝子発現のマーカーや蛋白質のトレーサーとして広く利用されている。