

## ヒト水晶体における新規蛍光物質の同定

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード: Glucosides, 質量分析, 水晶体, 白内障, ヒトXanthurenic Acid, 蛍光物質, ヒト, 老年者(65～) 作成者: 安藤, 佳奈子 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/4555">http://hdl.handle.net/2297/4555</a>

## ヒト水晶体における新規蛍光物質の同定

金沢大学大学院医学系研究科脳医科学専攻光情報伝達学

(旧講座名：眼科学)

(主任：河崎一夫教授)

安 藤 佳 奈 子

ヒト褐色白内障核(褐色核)と非褐色核間で、水晶体に含まれる遊離の低分子蛍光物質の含有量を比較した。その結果、既知の蛍光物質である3-ヒドロキシキヌレニングルコシド(3-hydroxykynurenine-O- $\beta$ -glucoside, 3HK-Glc), キヌレニン,  $\alpha$ -デアミノ-3-ヒドロキシキヌレニングルコシド( $\alpha$ -deamino-3-hydroxykynurenine-O- $\beta$ -glucoside, DHKN-Glc)の含有量は両者間で有意差を示さなかったが、 $\beta$ -グルコシドと推定される未同定の蛍光物質(a fluorophore, supposedly a  $\beta$ -glucoside, which increases in human brunescens lens nuclei, Fl-Glc)が褐色核で著明に多く含まれていた。非褐色核由来の低分子分画(MW < 10,000)を長期インキュベーションすると未知の蛍光物質(a fluorophore which increases in a low-molecular weight fraction of human non-brunescens lens nuclei during long-term incubation, Fl-X)が著明に増加した。高速液体クロマトグラフィー(high-performance liquid chromatography, HPLC)でFl-GlcとFl-Xを比較したところ、異なる2条件下でともにFl-GlcとFl-Xの保持時間は一致し、さらに両者の $\beta$ -グルコシダーゼ分解産物(アグリコン)からはともに蛍光ピークが検出されなかったため、Fl-GlcはFl-Xと同じ物質であると結論された。Fl-Xの質量分析の結果、Fl-XのMWが367であることがわかったため、そのアグリコンのMWは理論上205と推定された。Fl-XのアグリコンのHPLC上の保持時間は標準物質のキサンツレン酸(MW205)のそれと一致した。以上の結果よりFl-X (=Fl-Glc)はキサンツレン酸の $\beta$ -グルコシドであると推論された。Fl-X (=Fl-Glc)の生成経路については、酵素的に生成される可能性も否定できないが3HK-Glcをピリドキサル5'リン酸(pyridoxal-5'-phosphate, PLP)存在下でインキュベーションするとFl-Glcと同一保持時間の蛍光物質が著増することより、非酵素的に生成される可能性が示唆された。

**Key words** グルコシド, キサンツレン酸, 質量分析, 蛍光物質, 白内障

眼科受療者のうち高齢者の占める割合が近年増加しているが、これは老人性白内障患者の増加によるところが大きい<sup>1)</sup>。高齢者にみられる眼疾患の中でも老人性白内障は、昭和42年には全眼科受療者の6.8%であったのが、62年には34.5%と増えており<sup>1)</sup>、かつ高齢自動車運転免許保持者の増加<sup>2)</sup>を鑑みれば老人性白内障は、近年とみに重要性を増したと言える。北陸地域住民を対象とした疫学調査<sup>1)</sup>によると、老人性白内障の有所見率(白内障初期変化までを含めたもの)は40歳代では29.1%、50歳代では52.8%、60歳代では68.9%、70歳代では81.8%、80歳代では98.1%であり、加齢とともに著明に増加する。

日本や欧米諸国において人工水晶体の挿入を含めた白内障手術の普及は近年めざましいが、発展途上国ではまだ治療困難な疾患であり、全世界人口における失明原因の第1位は白内障である<sup>3)</sup>。したがって白内障の原因解明および手術以外の治療方法の開発は重要な意味を持つ。

老人性白内障の病型、程度分類に関しては国際的に統一され

た見解はないが、いくつかの白内障分類案が提唱されている。欧米のLOCS分類<sup>4)</sup>および我が国の白内障疫学研究班分類<sup>5)</sup>ではともに、水晶体核(核)着色、核混濁、水晶体皮質(皮質)混濁、水晶体囊(囊)下混濁のそれぞれについて数段階の程度に評価している。45歳以上の人口を対象として行った調査では核着色、核混濁、皮質混濁、囊下混濁の発現頻度はそれぞれ16.1%、28.6%、30.3%、8.7%であったとの報告がある<sup>6)</sup>。

核の着色あるいは混濁によって視力障害が生じるようになった状態は、核白内障と称される。人眼水晶体は生下時には、透明に近い淡黄色であるが、その後主に核において徐々に黄色調を増す。このような生理的な黄色化の機序や、病的状態である核白内障の発症機序および、両者の関連については不明な点が多い。核の着色の程度の評価は、生体眼では細隙灯顕微鏡所見に基づいて肉眼的に行われており、加齢に伴って生じる生理的着色と核白内障さらにそれが高度に進行した状態である褐色白内障を鑑別する明確な診断基準はない<sup>7)</sup>が、前出LOCS分類<sup>4)</sup>

平成13年10月1日受付, 平成13年12月13日受理

Abbreviations : ArbU, arbitrary unit; AU, area unit; DHKN-Glc,  $\alpha$ -deamino-3-hydroxykynurenine-O- $\beta$ -glucoside; Fl-Glc, a fluorophore, supposedly a  $\beta$ -glucoside, which increases in human brunescens lens nuclei; Fl-X, a fluorophore which increases in a low-molecular weight fraction of human non-brunescens lens nuclei during long-term incubation; Fl-X', a fluorophore which increases during incubation of 3-hydroxykynurenine-O- $\beta$ -glucoside with pyridoxal-5'-

を改訂したLOCS II分類<sup>9)</sup> および白内障疫学研究班分類<sup>5)</sup> などが便宜上用いられている。

近年の白内障手術の主流となっている超音波白内障手術は幅3 mm程度の小切開で水晶体を摘出することを可能にし、手術時間および術後安静期間の短縮、術後の乱視の軽減による良好な視力獲得等、手術の質的向上に大きく貢献した。核着色に伴って、核の硬度が増加するが、超音波白内障手術においては、核の硬度の増加は手技の難度を増し<sup>9)</sup>、合併症を増加させることが知られている。すなわち硬い核を超音波で破碎するのに多くのエネルギーを要する<sup>10)</sup> ので、角膜内皮損傷<sup>11)</sup>、創口熱変性による癒着不全等の合併症を増加させる。このような傾向は褐色白内障においては特に顕著である<sup>12)</sup>。従って、核白内障の成因をあきらかにし、その進行を遅らせることができれば、難度の高い手術を減らすことにつながる。

生理的および核白内障における核着色の増強に伴って、水晶体蛋白を波長350 nm付近で励起すると波長450 nm近傍で発せられる蛍光<sup>13)</sup>が増強することが知られているので、何らかの蛍光物質が核着色に関わる可能性が指摘されている<sup>14)~17)</sup>。これまでに水晶体蛋白に結合している蛍光物質として、アントラニル酸<sup>18)</sup>、2-アミノ-3-ヒドロキシアセトフェノンO- $\beta$ -D-グルコシド<sup>19)</sup>、 $\beta$ -カルボリン<sup>20)</sup>が挙げられるが、いずれの物質についても核の着色状態との相関を調べた報告はない。また、それらの蛍光物質を水晶体蛋白から分離するために種々の処理が施されているので、上記の蛍光物質がその処理過程で副産物として生成されたという可能性も否定できない。

一方、水晶体には数種類の蛍光物質が遊離の(水晶体蛋白に結合していない)状態で存在することもわかっており、それらのうちキヌレニン、3-ヒドロキシキヌレニングルコシド(3-hydroxykynurenine-O- $\beta$ -glucoside, 3HK-Glc)<sup>21)</sup> および $\alpha$ -デアミノ-3-ヒドロキシキヌレニングルコシド( $\alpha$ -deamino-3-hydroxykynurenine-O- $\beta$ -glucoside, DHKN-Glc)<sup>22)</sup>が同定されている。眼球に入射した光のうち、波長310 nm以下のUVは角膜で吸収され、水晶体に到達しないが、波長350 nm付近の近紫外線は角膜を透過し、水晶体に到達する。水晶体中の遊離の蛍光物質の作用として、近紫外線を吸収して網膜への近紫外線照射を減らす機能、すなわち近紫外線除去機能があるという可能性が示唆されている<sup>23)</sup>。また、水晶体中の遊離蛍光物質と白内障の関連については、これらの物質が光増感物質として働き活性酸素を発生させることで、核白内障で顕著に認められる水晶体蛋白の架橋・高分子化を促進するという可能性<sup>24)</sup>と、逆にこれらの物質が抗酸化作用を発揮して水晶体蛋白の変性を抑制するという可能性<sup>25)</sup>が指摘されている。これらの物質の中で最も多い3HK-Glcが、加齢と共に老人性白内障が増加することと相反して、40歳以降徐々に減少する<sup>26)27)</sup>ことを勘案すれば、3HK-Glcが核白内障形成を促進しているとは考えがたい。

上記の3種の物質以外に別種の遊離蛍光物質が核白内障の進行とともに増加し褐色白内障では著明に増加していることがBessemsら<sup>28)</sup>により指摘されているが、その構造は明らかでない。その後、当教室の岩瀬ら<sup>29)</sup>もある種の遊離蛍光物質が

褐色白内障核(褐色核)に特異的に多く含まれることを指摘し、この物質の構造は $\beta$ -グルコシドであると推定した。以下では、この $\beta$ -グルコシドと推定される蛍光物質をFl-Glc (a fluorophore, supposedly a  $\beta$ -glucoside, which increases in human brunescens lens nuclei) とする。Fl-Glcが褐色核に特異的に多いので、その性状の解明は核褐色化の原因究明に寄与することが期待される。しかし、褐色核中のFl-Glc量は物質質量としては微量であり、かつ近年の早期白内障手術の傾向や超音波手術の普及により摘出された褐色核標本が減少したので、同定に必要な量のFl-Glcを抽出するに足る褐色核を収集することは困難であった。ところが、我々は非褐色核から得られた低分子分画(MW<10,000)を37℃において長期間インキュベーションすると、ある蛍光物質Fl-X (a fluorophore which increases in a low-molecular weight fraction of human non-brunescens lens nuclei during long-term incubation)が著明に生成され、Fl-Xは高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography, HPLC) で、Fl-Glcに等しい保持時間にピークを有することを発見した。

本報では、遊離蛍光物質と核褐色化の関連を調べるために、キヌレニン、3HK-Glc, DHKN-Glc, Fl-Glcの含有量を褐色核と非褐色核間で比較した。さらに、Fl-XとFl-Glcの異同を決定し、Fl-Xの同定を試みた。また、Fl-Glcの生成経路の可能性を検討した。

## 材料および方法

### I. 材料

#### 1. 試薬

リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素二カリウム、リン酸、キヌレニン、キサントレン酸および $\beta$ -グルコシダーゼは和光純薬(東京)より購入した。3-ヒドロキシキヌレニン(3-hydroxykynurenine, 3HK)、リン酸緩衝生理食塩錠およびピリドキサル5'リン酸(pyridoxal-5'-phosphate, PLP)はSigma (St. Louis, USA)より購入した。DHKN-Glc<sup>22)</sup>は井上 周博士(ロート製薬)より提供された。

#### 2. 水晶体

水晶体囊外摘出法で得られた老人性白内障核を材料とした。核を研究目的に使用することおよびその結果を公表することに関して、すべての患者から同意を得た。本報ではLOCS II分類<sup>9)</sup> および白内障疫学研究班分類<sup>5)</sup> に準じて摘出された核を、うすい黄色(着色程度I)、黄色(着色程度II)、褐色がかった黄色(着色程度III)および褐色~赤褐色~黒色(着色程度IV)の4段階に分類し、着色程度IVを褐色白内障、着色程度IおよびIIを非褐色白内障と定義した。恣意的な分類を避けるために着色程度III<sup>7)</sup>の核を除外した。遊離蛍光物質の含有量を調べる実験では非褐色核13個(77.6 $\pm$ 5.8歳、平均値 $\pm$ 標準偏差)および褐色核8個(74.1 $\pm$ 9.5歳)を用い、Fl-X生成の時間経過およびFl-XとFl-Glcとの異同を調べる実験には非褐色核3個(71, 72, 76歳)および褐色核1個(76歳)を用い、Fl-Xの精製のためには非褐色核10個を用いた。核は-20℃で凍結保存し、使用時に解凍

phosphate; 3HK, 3-hydroxykynurenine; 3HK-Glc, 3-hydroxykynurenine-O- $\beta$ -glucoside; HPLC, high-performance liquid chromatography; LC/MS, liquid chromatography/mass spectrometry; PLP, pyridoxal-5'-phosphate; XA-Glc, xanthurenic acid glucoside

核, 水晶体核; 囊, 水晶体囊; 皮質, 水晶体皮質

した。

## II. 低分子分画の抽出

遊離蛍光物質の含有量を調べる実験では、核1個当たりには100 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) 1.2 mlを加え、その他の実験では核1個当たりには20 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 5.6) 1.5 mlを加え、均一化し、10,000 Gで10分間遠心後、上清を採取し、分画分子量 (MW) 5,000の限外濾過膜 (ウルトラフリー C3-LCC, 日本ミリポアリミテッド, 東京) または MW10,000の限外濾過膜 (Microcon-10, Amicon, Bedford, USA) で濾過した。このようにして得られた濾液を低分子分画と定義した。

## III. FI-Xの精製

無菌的に調製した非褐色核の低分子分画を、滅菌したポリプロピレン製マイクロチューブに入れて密閉し、37 °Cで約12週間静置した。マイクロチューブ内の気体の置換や脱気を行わなかった。静置の後マイクロチューブ内容をSep-Pak C18 (日本ミリポアリミテッド) で濃縮し、まずHPLC条件3で、次に条件4で分離精製した後、遠心濃縮した。

## IV. 3HK-Glcの精製

貯蔵されていた水晶体10個から得られた低分子分画から、まずHPLC条件3で、次に条件4で分離精製し、遠心濃縮した。

## V. HPLC

遊離蛍光物質の含有量を調べる実験では、ポンプにはHLC803-D (東ソー, 東京), インジェクターには7125 (Rheodyne, Rohnert Park, USA), システムコントローラーにはGE-4 (東ソー) をそれぞれ用いた。その他の実験では、システムコントローラー (SCL-6A, 島津製作所, 東京) とポンプ2台 (LC-6A, 島津製作所) を用いた。試料注入量は実験1, 2, 3および5では15  $\mu$ l, 実験6では10  $\mu$ lであった。波長350 nmにおけるUV吸光度を吸光度計 (SPD-6A, 島津製作所) で、励起波長350 nm/蛍光波長440 nmにおける蛍光強度を蛍光検出計 (機種後記) で計測し、インテグレーター (C-R3AとC-R6A, 島津製作所) に出した。蛍光検出計として、後述の実験1, 2および実験3のうちのHPLC条件2, 3を使用したものならびに実験5ではRF-530 (島津製作所) を、実験3のうちのHPLC条件4を使用したものおよび実験6にはRF-10Axl (島津製作所) を用いた。HPLC分析を下記の4種類の条件で行った。

1. カラム, TSK-GEL ODS-80Ts (内径4.6 mm×実効長15 cm, 東ソー)。移動相溶媒A液 [100 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0)], 移動相溶媒B液 [100 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0), アセトニトリル1対1混合液]。流速1.0 ml/分。30分間でB液0%から100%までの直線勾配。

2. カラム, 条件1と同じ。移動相溶媒A液 [20 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 5.6)], 移動相溶媒B液 (60%メタノール)。流速0.8 ml/分。5分までA液単独, 5分から80分にかけてB液100%まで直線勾配。

3. カラム, TSK-GEL Super ODS (内径4.6 mm×実効長10 cm, 東ソー)。移動相溶媒, HPLC条件2と同じ。流速0.8 ml/分。5分までA液単独, 5分から20分にかけてB液40%まで直線勾配, 20分以降A液単独。

4. カラム, 条件3と同じ。移動相溶媒 (20 mM酢酸アンモニウム:アセトニトリル=97.5:2.5のみ)。流速0.8 ml/分。

## VI. 液体クロマトグラフィー/質量スペクトロメトリー (liquid chromatography/mass spectrometry, LC/MS) による

## 質量分析

分析器にはM-8000型 (日立製作所, 東京) を用いた。カラムにはTSK-GEL Super ODSを用い、カラム温度は40 °Cで以下の条件で行った。移動相溶媒A液, 純水。移動相溶媒B液, メタノール。流速0.5 ml/分。5分までA液単独, 5分から20分にかけてB液40%まで直線勾配, 20分から25分にかけてB液100%まで直線勾配, 30分までB液単独, 30分以降はA液単独。エレクトロスプレーイオン化法。シールド温度, 250 °C:第一細孔温度, 150 °C:ドリフト電圧, 40 V:走査範囲, m/z (質量/荷電) =100~1,500。

## VII. 各実験の条件

### 1. 非褐色核と褐色核での遊離蛍光物質含有量の比較 (実験1)

個々の核から個別に得られた低分子分画をHPLC条件1で分析し、個々の核におけるそれぞれの蛍光物質の含有量を求めた。クロマトグラム上における3HK-GlcとFI-Glcのピークは既報の如く<sup>29)</sup>、キヌレニンとDHKN-Glcのピークは標準物質との比較により特定した。個々の核における3HK-Glc含有量 (本論文では核湿重量当たりの3HK-Glcモル数を含有量と定義する) は、3HK-Glcから発せられる蛍光が微弱で定量の指標としては不適当なので、3HK-GlcのUV吸光ピーク面積を指標として求められた。下記の方法で試料単位容積中の3HK-Glcのモル数を知り、この値を核1個から得られる試料全量当たりに換算することで核1個に含まれる3HK-Glcのモル数を求め、それを核湿重量で除した。

試料単位容積中に含まれる3HK-Glcのモル数は以下の如く算出された。1分子の3HK-Glcが $\beta$ -グルコシダーゼによって分解されると1分子の3HKが生じる。1つの核から等量の試料を2つ用意し、一方に $\beta$ -グルコシダーゼ溶液を、他方に $\beta$ -グルコシダーゼ溶液と同量の100 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) のみを添加する。2つの試料をともに37 °C, 48時間静置した後にHPLCに注入した場合、前者のHPLC注入液に含まれる3HKのモル数と後者のHPLC注入液に含まれる3HK-Glcのモル数は、 $\beta$ -グルコシダーゼによる分解が完全であると仮定すれば等しい。このモル数は、前者の3HKのUV吸光ピーク面積を純品の3HKと比較すれば知ることができる。キヌレニンの含有量は純品のキヌレニンとの比較でHPLC注入試料中のモル数を知り、この値を核1個から得られる試料全量当たりに換算することで核1個に含まれるキヌレニンのモル数を求め、それを核湿重量で除して得た。DHKN-GlcおよびFI-GlcはHPLC上のピーク面積 (area unit, AU) を核湿重量で除して得た値を含有量の指標とした。

### 2. 静置下におけるFI-Xおよび3HK-Glcの経時的変化 (実験2)

3個の非褐色核から個別に無菌的に調製された低分子分画をIIIと同様の方法で37 °Cにて無菌的に静置し、3週間毎に9週まで、上記のHPLC条件2で分析した。

### 3. FI-XとFI-Glcの異同 (実験3)

褐色核 (76歳) の低分子分画 (FI-Glcを含む) とFI-XをHPLC条件3および4で分析し、FI-GlcとFI-Xの保持時間を2種のHPLC条件下で比較した。また、褐色核の低分子分画とFI-Xにそれぞれ $\beta$ -グルコシダーゼを0.1%の濃度になるように添加し、37 °Cで2時間静置後HPLC条件3で分析した。

### 4. FI-Xの質量分析 (実験4)

LC/MSでFI-Xを分析した。

### 5. FI-Xのアグリコンとキサンツレン酸との比較 (実験5)

種々のトリプトファン代謝産物のうち、実験4の結果で示唆されたFl-Xのアグリコンに等しいMWを持つキサンツレン酸を、HPLC条件3で分析した。

#### 6. 3HK-Glcの静置に伴う経時的变化(実験6)

3HK-Glcをリン酸ナトリウム緩衝生理食塩水(pH 7.4)で溶解し、0.1 mM PLP存在下および非存在下で無菌的に37℃で静置し、3HK-Glc量と生成蛍光物質量をHPLC条件4で調べた。

### 成 績

#### I. 褐色白内障と非褐色白内障における遊離蛍光物質含有量の比較

3HK-Glc含有量(図1A)は非褐色核で $0.67 \pm 0.38 \mu\text{mol/g}$ 湿重量、褐色核で $0.85 \pm 0.62 \mu\text{mol/g}$ 湿重量であり、両者間で有意差を示さなかった( $0.05 \leq p < 0.1$ )。キヌレニン含有量(図1B)は非褐色核で $0.016 \pm 0.011 \mu\text{mol/g}$ 湿重量、褐色核で $0.029 \pm 0.021 \mu\text{mol/g}$ 湿重量であり、両者間で有意差を示さなかった( $0.05 \leq p < 0.1$ )。DHKN-Glc含有量(図1C)は非褐色核で $4.1 \times 10^5 \pm 2.9 \times 10^5 \text{ AU/g}$ 湿重量、褐色核で $6.3 \times 10^5 \pm 5.0 \times 10^5 \text{ AU/g}$ 湿重量であり、両者間で有意差を示さなかった( $0.05 \leq p < 0.1$ )。それに対し、Fl-Glc含有量(図1D)は非褐色核で $2.6 \times 10^3 \pm 6.3 \times 10^3 \text{ AU/g}$ 湿重量、褐色核で $1.5 \times 10^5 \pm 1.0 \times 10^5 \text{ AU/g}$ 湿重量であり、褐色核で有意に増加していた( $p < 0.01$ )。

#### II. 静置下におけるFl-Xおよび3HK-Glcの経時的变化

非褐色核の低分子分画を9週間静置した後では、静置前(図2A,B)には見られなかった新たなUV吸光ピークが保持時間23分~28分に数本出現し(図2C)、26分近傍に顕著な蛍光ピークが現れた(図2D)。静置に伴って増加するこの蛍光ピークに相当する物質をFl-Xと呼ぶ(緒言参照)。UV吸光クロマトグラムでは、静置前に最も大きなピークとして認められた保持時間10分近傍のピーク(図2A)は静置後に著明に小さくなった(図2C)。保持時間10分近傍のUV吸光ピーク(図2A,C)は、 $\beta$ -グルコシダーゼ添加によりこのピークが消失し3HKの保持時間に等しい保持時間に新たなピークが出現すること(図略)、および他の報告<sup>27,30)</sup>の逆相HPLCを用いた水晶体可溶性低分子分画のクロマトグラムではこのピークに相当する物質としては3HK-Glcのみが描画されていることから、3HK-Glcのピークであると判断された。従来から、3HK-Glcは非トリプトファン蛍光物質として知られている<sup>21)</sup>が、このHPLC条件では蛍光ピークは観察されなかった(図2B)ので、3HK-GlcではUV吸光度に比して蛍光強度は弱いことが示された。一方、Fl-Xは26.2分に大きな蛍光ピークを示した(図2D)のに対し、UV吸光クロマトグラムでは26.1分に小さいピークを示す(図2C)のみだったので、Fl-Xは、UV吸光度に比して非常に強い蛍光強度を有することが判った。

調べた3個の非褐色核すべてについて、静置中にFl-Xの蛍光ピーク面積は経時的に増加し(図3A)、3HK-GlcのUV吸光ピーク

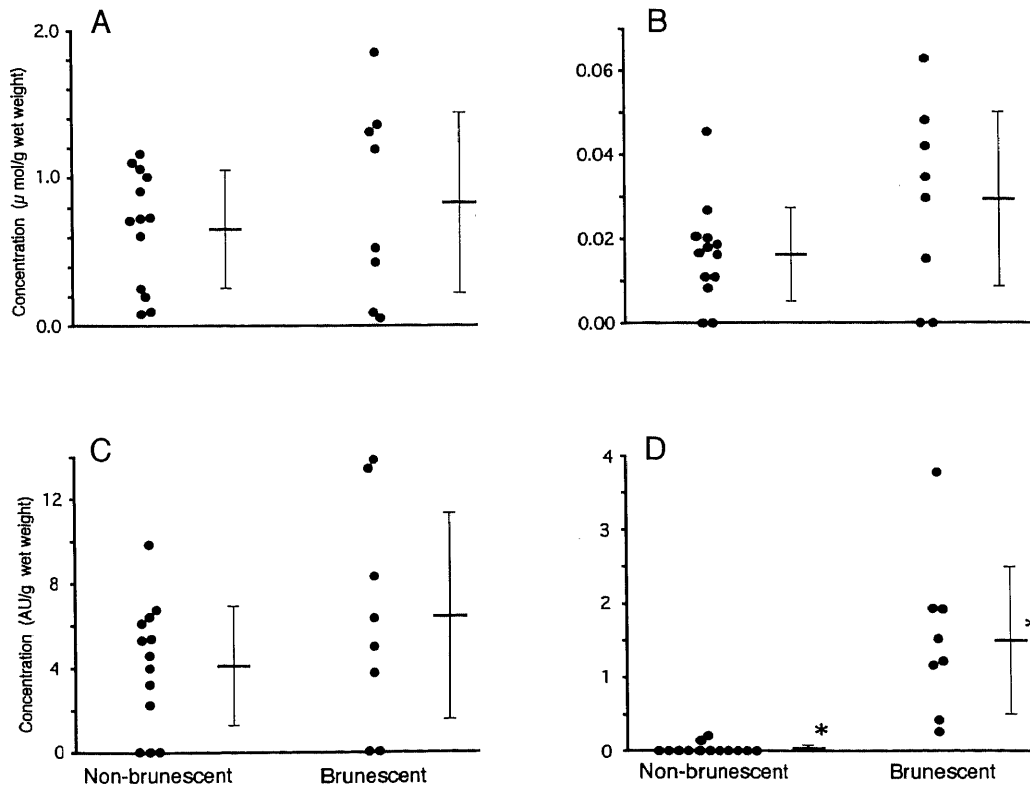


Fig. 1. Comparison of concentrations of protein-unbound fluorophores between non-brunescenscent and brunescenscent nuclei. (A)3HK-Glc, (B)kynurenine, (C)DHKN-Glc, (D)Fl-Glc. The ordinate designates concentrations in  $\mu\text{mol/g}$  wet weight or  $\text{AU/g}$  wet weight. Each bar represents  $\bar{X} \pm 1\text{SD}$ . No significant differences ( $0.05 \leq p < 0.1$ ) between non-brunescenscent and brunescenscent nuclei are observed in the concentrations of 3HK-Glc, kynurenine and DHKN-Glc. \* Fl-Glc is present in significantly higher amount in brunescenscent than in non-brunescenscent nuclei( $p < 0.01$ ). AU, area unit.

ク面積は経時的に減少した (図3B).

### Ⅲ. FI-XとFI-Glcの異同

HPLC条件3を用いた分析では、FI-Glcの蛍光ピークは保持時間14.8分にあり (図4B), FI-Xの蛍光ピークの保持時間と一致した (図4D). FI-XのUV吸収ピークは14.7分に (図4C), FI-Glcのそれも14.7分に小さく認められた (図4A). FI-GlcとFI-Xはともに、UV吸収ピークの大きさに比して蛍光ピークが非常に大きかった.

HPLC条件4を用いた分析でもFI-Glcの蛍光ピーク (図5B)の

保持時間 (6.6分) はFI-Xの蛍光ピーク (図5D)のそれと一致した. また、褐色核の低分子分画と褐色核の低分子分画中のFI-Glcの濃度とほぼ等しくなるように希釈したFI-Xを等量混合してHPLC条件3および4で分析したところ、いずれの条件下でも蛍光ピークは約2倍の高さの1本のピークとして認められた (図略).

褐色核の低分子分画とFI-Xの $\beta$ -グルコシダーゼ処理実験では、 $\beta$ -グルコシダーゼ非処理時には認められたFI-Glcの蛍光ピーク (図4B)およびFI-Xの蛍光ピーク (図4D)は、 $\beta$ -グルコシ

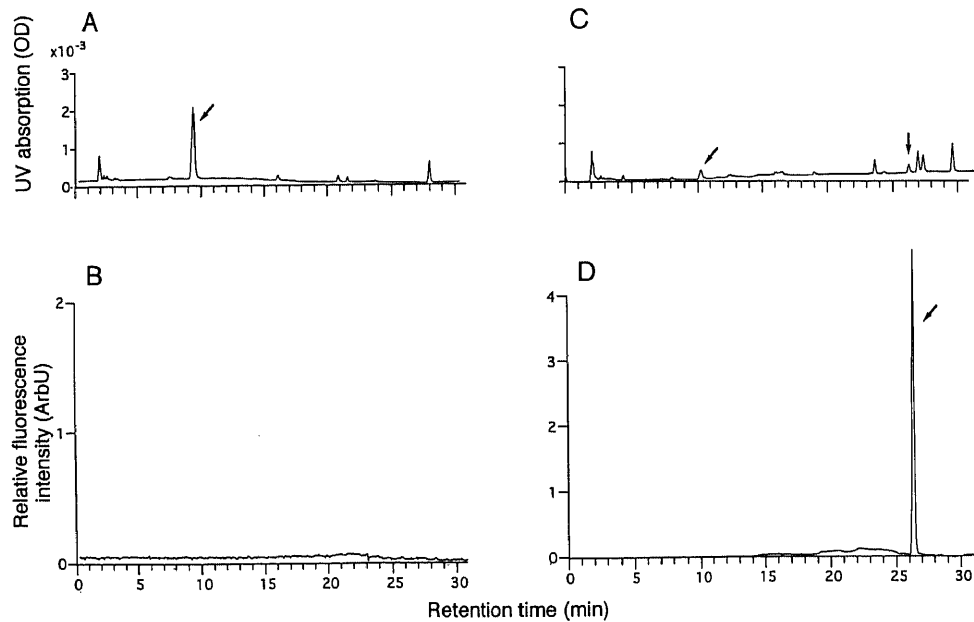


Fig. 2. HPLC profiles of the low-MW fractions (MW < 10,000) extracted from non-brunescens nuclei before (A,B) and after (C,D) incubation (37 °C, 9 weeks). Upper traces, UV absorption (350 nm) in OD; lower traces, fluorescence (excitation/emission: 350 nm/440 nm) in ArbU (likewise in Fig. 4 ~ 6,8). The abscissa shows retention time in min (likewise in Figs. 4 ~ 6, 8). Separation was performed on a TSK-GEL ODS-80Ts column at a flow rate of 0.8 ml/min. The column was eluted with 20 mM phosphate buffer (pH 5.6) for the initial 5 min and a linearly graded eluent to 60 % methanol in water over 75 min. UV absorption peaks supposed to be 3HK-Glc are observed with a retention time about 10 min (arrows) (A,C). After incubation (C,D), new peaks of FI-X are found with a retention time of 26.1~26.2 min (arrows). ArbU, arbitrary unit.

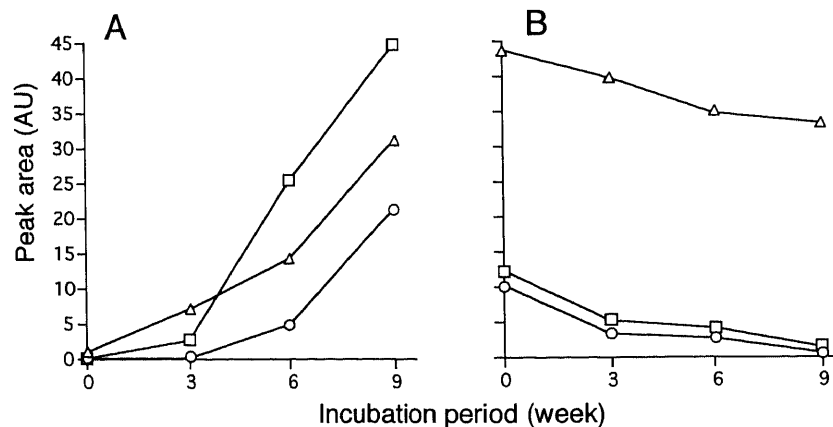


Fig. 3. Time course of relative concentrations of FI-X (A) and 3HK-Glc (B) during incubation of low-MW fraction extracted from non-brunescens nuclei at 37 °C. Analyses by HPLC were performed once every 3 weeks. Symbols (○, △, □) designate individual samples. The abscissa shows incubation period (week). The ordinate shows peak area in AU. The HPLC condition was the same as that used in Fig. 2.

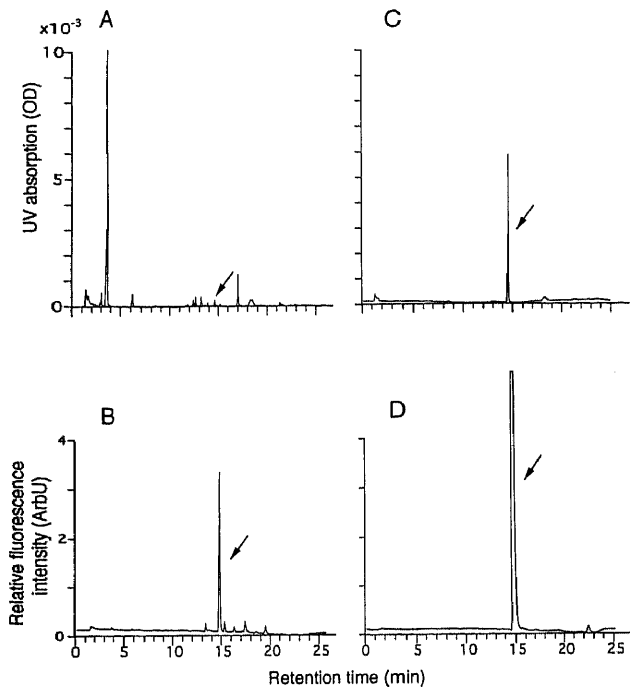


Fig. 4. HPLC profiles of the low-MW fraction extracted from a brunescent nucleus (containing FI-Glc (A,B), and FI-X(C,D)). Separation was performed on TSK-GEL Super ODS column at a flow rate of 0.8 ml/min. The column was eluted in the following sequence: 20 mM phosphate buffer (pH 5.6) for the initial 5 min, linearly gradated eluent to a 40: 60 mixture of 60 % methanol in water and 20 mM phosphate buffer over 15 min, and then the initial eluent again. The retention time of FI-X (arrows) (C,D) was the same as that of FI-Glc (arrows) (A,B). Though the fluorescence peak for FI-X apparently saturated on the recorder, the calculation of peak areas was performed within the dynamic range of the integrator (D) (likewise in Fig. 5).

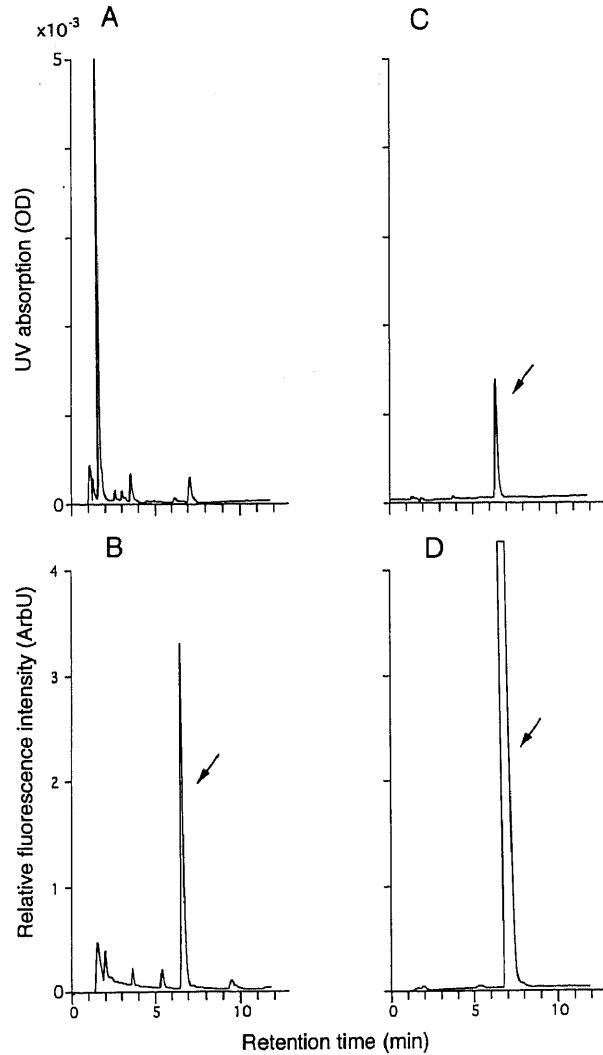


Fig. 5. HPLC profiles of the low-MW fraction extracted from a brunescent nucleus (containing FI-Glc (A,B), and FI-X(C,D)). Separation was made on TSK-GEL Super ODS column at a flow rate of 0.8 ml/min. The eluent was isocratic 20 mM ammonium acetate: acetonitrile=97.5: 2.5. Note that the retention time of FI-X (arrows) (C,D) is the same as that of FI-Glc (arrow) (A,B).

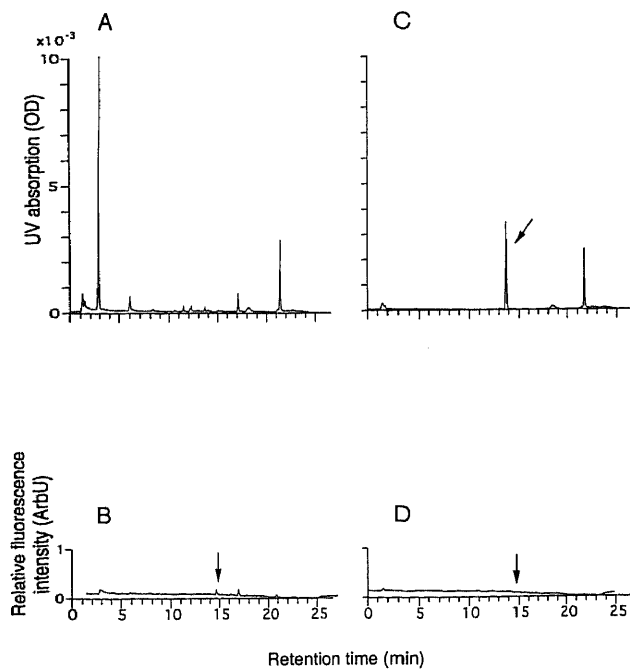


Fig. 6. HPLC profiles of the low-MW fraction extracted from a brunescent nucleus (containing FI-Glc (A,B), and FI-X(C,D)) after treatment with  $\beta$ -glucosidase (0.1 %w/v) at 37 °C for 2 hr. HPLC condition was the same as in Fig. 4. The fluorescence peaks of FI-Glc and FI-X disappear after  $\beta$ -glucosidase treatment (arrows) (B,D) and a new absorption peak with a retention time of 13.8 min is seen (arrow) (C).

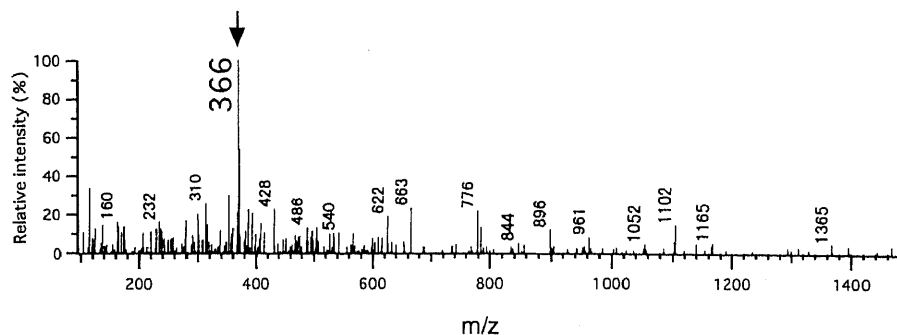


Fig. 7. Mass spectra of FI-X. Negative-ion analysis. Separation was made on TSK-GEL Super ODS column at a flow rate of 0.5 ml/min. The column was eluted in the following sequence: water for the initial 5 min, linearly gradated eluent to 40 % methanol over 15 min and another linearly gradated eluent to 100 % methanol over the next 5 min, 100 % methanol only for the next 5 min, and then the initial eluent again. The abscissa shows mass/charge ( $m/z$ ). The ordinate shows relative intensity (%) to the maximal intensity observed in the examined spectrum. Electro-spray ionization was performed with a 40-V electron beam. The deprotonated ion of FI-X is shown at  $m/z$  366 (arrow).

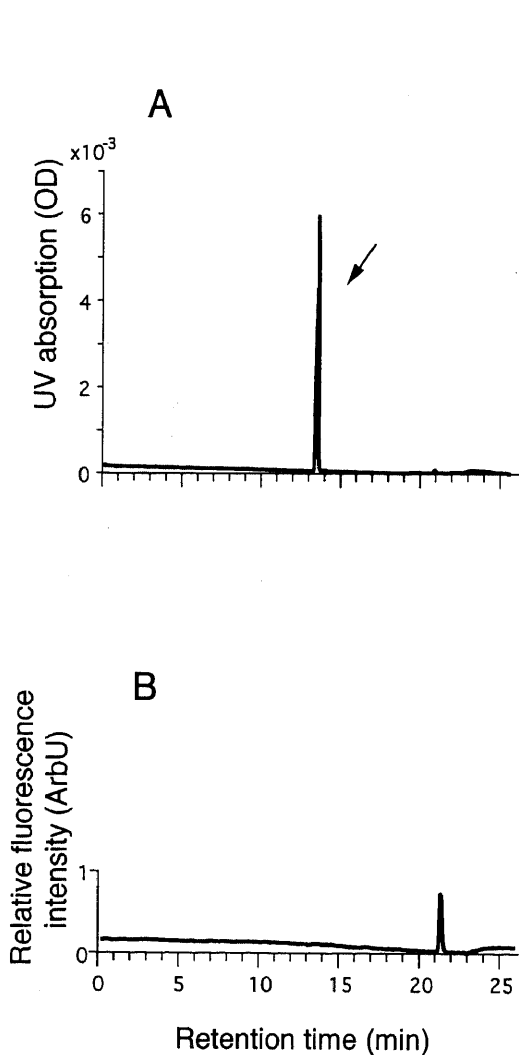


Fig. 8. HPLC profile of authentic xanthurenic acid. The HPLC condition was the same as in Fig. 4. The retention time of xanthurenic acid (arrow) (A) is the same as that of the aglycon of FI-X (Fig. 6 C, arrow).

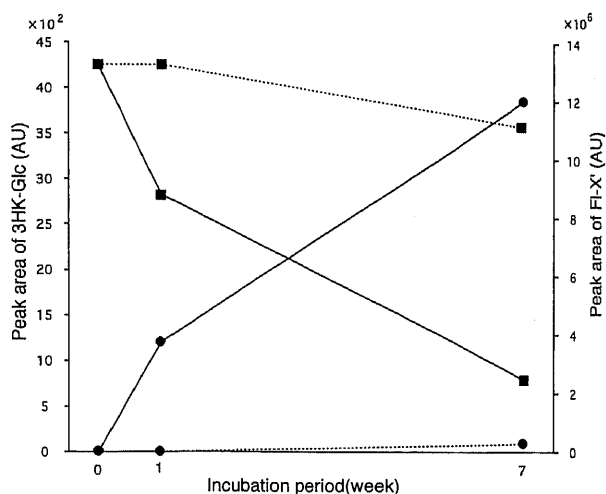
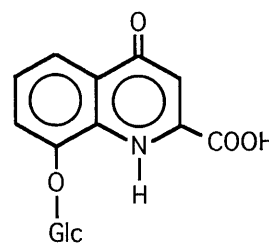


Fig. 9. Time course of the concentrations of 3HK-Glc (■) and FI-X' (●) during incubation of purified 3HK-Glc in the absence (---) and the presence (—) of PLP. The abscissa shows incubation period (week). The ordinate shows peak area in AU. FI-X', a fluorophore which increases during incubation of 3HK-Glc with PLP.



Xanthurenic acid 8-O- $\beta$ -D-glucoside (XA-Glc)

Fig. 10. Presumed structure of XA-Glc.

ダーゼ処理後にはいずれも消失し (図6B,D),  $\beta$ -グルコシダーゼ非処理時には14.7分に認められた (図4C) FI-XのUV吸収ピークは消失し, 新たなピークが13.8分出現した (図6C).

IV. FI-Xの質量分析

FI-Xの負イオン測定では脱プロトン化分子が $m/z=366.0$ に検出された (図7) ので, FI-XのMWは367と推定された. FI-XのMWが367ならば, 理論上FI-XのアグリコンのMWは205である.

V. FI-Xのアグリコンとキサンツレン酸との比較

標準物質のキサンツレン酸 (MW205) のUV吸収ピークは13.8分に認められ (図8A), 実験3で示したFI-Xのアグリコンの

UV吸収ピーク (図6C) の保持時間と一致した.

VI. 3HK-Glcの静置に伴う経時の変化

PLP非存在下では3HK-Glcは7週後にわずかに減少し (図9), FI-Glcと同じ保持時間にごくわずかの蛍光ピークが検出されたのみであったが, PLP存在下では3HK-Glcは徐々に減少し, 7週後にはほとんど検出されなくなり, FI-Glcと同じ保持時間を有する新たな蛍光物質FI-X' (a fluorophore which increases during incubation of 3-hydroxykynurenine-O- $\beta$ -glucoside with pyridoxal-5'-phosphate) が多量に生成された (図9).

考 察

ヒト水晶体に含まれる遊離蛍光物質のうち, キヌレニン, 3HK-Glc, DHKN-Glcの含有量は非褐色核と褐色核間で有意差を示さなかったのに対し, FI-Glcは非褐色核に比べて褐色核で有意に多く含有されていた (図1).

FI-XとFI-Glcは, HPLCの2つの条件下のいずれでもよく一致した保持時間の蛍光ピークを有し (図4, 5), とともに $\beta$ -グルコシダーゼ処理によってその蛍光ピークを失い (図6), かつともにUV吸光度に比して非常に高い蛍光強度を示した (図2C,D, 図4A,B) から, 両者が同一であると推定される. また, HPLCの結果 (実験5) から, FI-Xのアグリコンがキサンツレン酸であることが示され, FI-XのMWが367 (実験4) であるから, FI-Xはキサンツレン酸にグルコースが1分子 $\beta$ 結合したキサンツレン酸のグルコシド (xanthurenic acid glucoside, XA-Glc) と結論される. すなわち, 褐色白内障水晶体核で特異的に増加しているFI-Glc<sup>29)</sup>は, 非褐色水晶体の低分子分画を37℃で静置することによって著明に増加するFI-Xと同一物質であることが確認され, FI-X (=FI-Glc) がキサンツレン酸のグルコシドであると結論される. 非褐色水晶体の低分子分画を37℃で静置することによって経時的にFI-X (FI-Glc) が増加しそれに並行して3HK-Glcが減少すること (図3) は, この間に3HK-GlcがXA-Glcに変化したことを示唆する. そこで分離精製された3HK-Glcを長期間無菌的に37℃で静置し, その変化を調べた. 3HK-Glc単独では7週たってもほとんど変化がみられなかったが, PLPを添加すると速やかにFI-Xに等しいHPLC保持時間を持つ物質 (FI-X') に変化した (図9). 37℃での静置によって水晶体低分子分画中の3HK-Glcは経時的に減少しその代わりにFI-Xが増加すること (図3) および図9の結果を併せて考えれば, 3HK-GlcはPLP存在下でFI-X (=FI-Glc=XA-Glc) に変化したと推察される.

XA-Glcは, ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) のeye-color mutantに存在することが報告<sup>31)</sup> されているが, それ以外の動物における存在は我々が知る限り報告されていない. XA-Glc (図10)のハエの眼における生成経路としては, 3HKからキサンツレン酸を経てXA-Glcになる経路 (図11A)<sup>32)</sup> と, 3HKから3HK-Glcを経てXA-Glcになる経路 (図11B)<sup>32)</sup> が想定されて

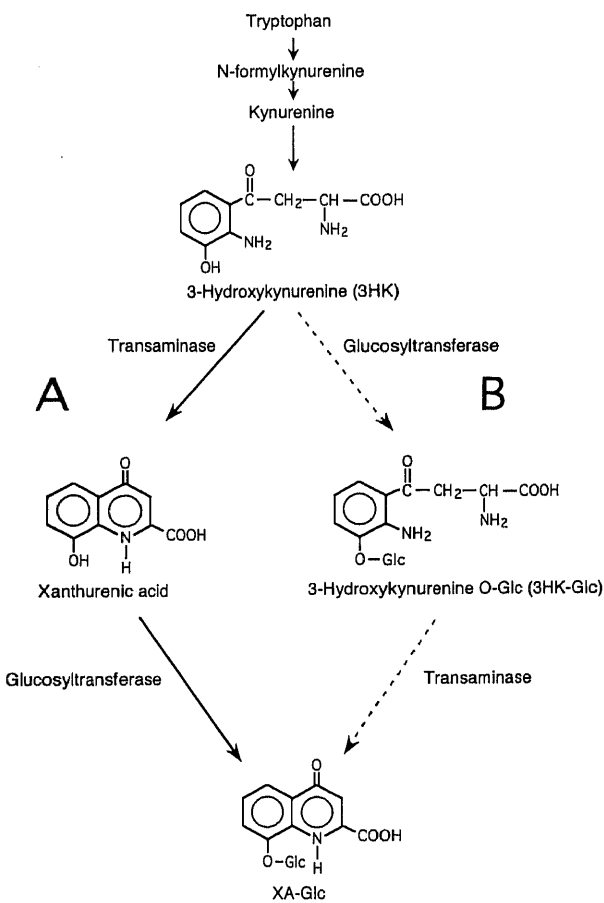


Fig. 11. Possible pathways for the biosynthesis of XA-Glc in *Drosophila melanogaster* (modified from Real et al. 1990<sup>32)</sup>). XA-Glc was produced as a by-product of the tryptophan-xanthommatin pathway in *Drosophila*.

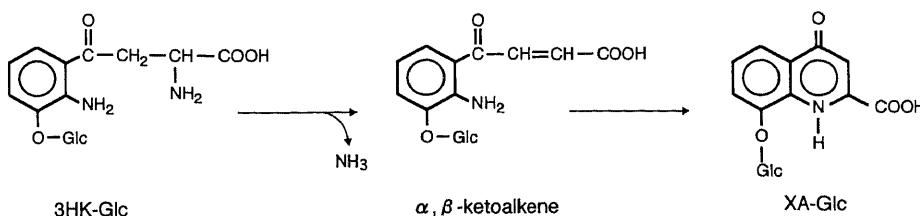


Fig. 12. Presumed pathway for non-enzymatic conversion of 3HK-Glc to XA-Glc.

おり、いずれも酵素を介した代謝経路であることが示唆されている<sup>32)</sup>。ヒト生体内においてもハエの眼と同様に酵素を介した経路が考えられる(図11A,B)。まず、ヒト水晶体には微量ながら遊離の3HKが存在し<sup>21)27)33)</sup>、遊離のキサントレン酸自体の存在は報告されていないものの、キサントレン酸の酸化型であるオクソキサントレン酸および2オクソキサントレン酸が存在し<sup>34)</sup>、老人性白内障水晶体でキサントレン酸トランスアミナーゼの活性が証明されている<sup>35)</sup>ので、図11の経路Aの可能性は否定できない。次に、3HK-Glcは水晶体上皮細胞においてトリプトファンの代謝によって常時作られ、水晶体中に貯留してから後嚢を透過して硝子体へ移行する<sup>27)</sup>から、褐色白内障水晶体では硝子体へ移行する前に3HK-GlcがトランスアミナーゼによってXA-Glcに変化するという可能性、すなわち図11の経路Bの可能性もある。

一方、本報における非褐色低分子分画の試料はMW10,000の限外濾過液なので、その静置によりXA-Glcが生成する反応に酵素が関与するとは考えがたい。本報におけるXA-Glc (=Fl-Glc) の非酵素的生成経路の候補を図12に示す。すなわち、まず3HK-Glcが脱アミノされ $\alpha$ 、 $\beta$ ケトアルケンが生じ、さらに $\alpha$ 、 $\beta$ ケトアルケンの側鎖が閉環してキノリン環が形成されXA-Glcが生じるという経路である。本報では3HK-Glcの単独静置ではXA-Glcがほとんど生成されない(図2)のに対し、3HK-GlcをPLP存在下で静置するときわめて効率よくXA-Glcが生成されることがわかった(図2)。PLPはビタミンB<sub>6</sub>の代謝産物で、生体ではトランスアミナーゼ等の酵素によるアミノ酸のアミノ基転移等の反応を触媒する補酵素として重要な働きをしていることが知られているが、いくつかのアミノ酸では非酵素的にアミノ酸を脱アミノ化することも報告されている<sup>36)37)</sup>。人眼水晶体中においてPLPが存在するか否かについての報告はみあたらないが、本報の実験2で非褐色核低分子分画の試料を静置することでFl-Glc (=XA-Glc) が著明に生成されたことは人眼水晶体中にアミノ基を転移させる作用をもつPLPあるいはPLPと類似の物質が含まれていることを示唆している。

褐色白内障におけるXA-Glcの由来に関しては、褐色白内障においては還元型グルタチオンが減少していることが報告<sup>38)</sup>されているので、長期静置においてXA-Glc (=Fl-X) が生じたのと同様に非酵素的に3HK-Glcが脱アミノ化されてXA-Glcが生じた可能性も考えられる。

ヒト水晶体水溶性低分子分画中に含まれる非トリプトファン蛍光物質のうち、キヌレニン、3HK-Glc、DHKN-Glcと核着色とは関連しないが、Fl-Glc (=XA-Glc)は核着色に関連する<sup>29)</sup>。水晶体内蛍光物質が光増感作用を介して核白内障を促すという説がある<sup>24)39)</sup>ことから、このこととXA-Glcが非褐色核に比べて褐色核で特異的に多く存在するという本報結果を勘案すれば、XA-Glcが光増感作用を発揮して核のタンパクの凝集などに関与している可能性が考えられる。

## 結 論

褐色核に特異的に多い蛍光物質Fl-Glcと非褐色核を静置すると生成される蛍光物質Fl-Xの異同を検討するため、両者およびそのアグリコンのHPLC上の保持時間を比較した。またFl-Xの質量分析を行った。その結果、Fl-GlcはXA-Glcである可能性が示唆されたので、Fl-GlcとXA-Glcの異同をHPLCを用いて検討した。これら一連の研究の結論は以下の通りであった。

1. ヒト水晶体中の遊離蛍光物質として既知の3HK-Glc、キヌレニン、DHKN-Glcの含有量は非褐色核と褐色核間で有意差を示さなかったが、1種類の未知の蛍光物質(Fl-Glc)は褐色核で著明に増加していた。

2. 非褐色核低分子分画を37℃で長期静置すると1種類の未知の蛍光物質(Fl-X)が著明に増加した。

3. Fl-GlcとFl-XのHPLC上の保持時間は異なる2つのHPLC条件下で一致し、Fl-GlcとFl-Xの蛍光ピークはともに $\beta$ -グルコシダーゼ処理で消失したから、Fl-GlcとFl-Xが同一物質である可能性が極めて高い。

4. LC/MSの結果よりFl-XのMWは367であることが示され、それゆえFl-XのアグリコンのMWは205と推定される。

5. トリプトファン代謝物の一つであるキサントレン酸(MW205)とFl-Xのアグリコンは、HPLC上で等しい保持時間を有した。

6. 分離精製された3HK-Glcを長期間静置してもFl-Glcと同じ保持時間に蛍光ピークはわずかに認められるのみであったが、PLPを添加すると3HK-Glcは著明に減少しFl-Glcと同じ保持時間に強い蛍光ピークが認められた。

以上の結果より、褐色白内障水晶体核において著明に多く含まれる蛍光物質はキサントレン酸のグルコシドであり、それはPLP存在下では3HK-Glcから非酵素的に生じることが示された。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師金沢大学大学院医学系研究科脳医学専攻光情報伝達学 河崎一夫教授ならびに終始直接御指導、御校閲いただきました金沢大学大学院医学系研究科脳医学専攻光情報伝達学 白尾 裕助教授、白尾悦子先生に深甚なる謝意を捧げます。また、本研究の遂行に際し、貴重な御協力をいただきました金沢大学大学院医学系研究科脳医学専攻光情報伝達学の皆様および水晶体核を御提供下さった諸先生方へ心から感謝いたします。

## 文 献

- 1) 加藤信世, 佐々木一之. 疫学的見地からみた老人性白内障. 眼科MOOK45白内障診療ガイド(佐々木一之編), 第1版, 1-10頁, 金原出版, 東京, 1990
- 2) 警察白書平成11年版(警察庁編), 第1版, 328頁, 大蔵省印刷局, 東京, 1999
- 3) Kupfer C. Worldwide prevention of blindness. Am J Ophthalmol 96: 543-545, 1983
- 4) Chylack LT Jr, Leske MC, Sperduto R, Khu P, McCarthy D. Lens opacities classification system. Arch Ophthalmol 106: 330-334, 1988
- 5) 佐々木一之, 柴田崇志, 尾羽沢大, 藤原隆明, 小暮文雄, 小原喜隆, 他. 白内障分類試案. 日眼会誌 93: 796-800, 1989
- 6) Xu J, Yu Q, Zhu S, Liu Q. A population-based study of lens opacities. Eye Science 12: 115-117, 1996
- 7) 高久 功. 水晶体疾患. 最新眼科学(三島濟一, 植村恭夫編), 第1版, 216頁, 朝倉書店, 東京, 1984
- 8) Chylack LT Jr, Leske MC, McCarthy D, Khu P, Kashiwagi T, Sperduto R. Lens opacities classification system II (LOCS II). Arch Ophthalmol 107: 991-997, 1989
- 9) 村松隆次. 偽水晶体眼水疱性角膜症. Eye Surgery Now illustrated 6 水疱性角膜症(大橋裕一編), 第1版, 90-95頁, メジカルビュー社, 東京, 1997

- 10) 大鹿哲郎. 小切開創白内障手術, 第1版, 78頁, 医学書院, 東京, 1994
- 11) 澤 充. 角膜内皮障害. 眼科診療プラクティス 1, 眼内レンズの使い方と実際 (臼井正彦編), 第1版, 216-220頁, 文光堂, 東京, 1992
- 12) 永原 幸. 創口の熱傷. Eye Surgery Now illustrated 1, 白内障手術-術中・術後合併症対策 (大鹿哲郎編), 第1版, 43-47頁, メジカルビュー社, 東京, 1996
- 13) Satoh K, Bando M, Nakajima A. Fluorescence in human lens. *Exp Eye Res* 16: 167-172, 1973
- 14) Pirie A. Color and solubility of the proteins of human cataracts. *Invest Ophthalmol* 7: 634-650, 1968
- 15) Augusteyn RC. Distribution of fluorescence in the human cataractous lens. *Ophthalmic Res* 7: 217-224, 1975
- 16) Lerman S, Borkman R. Spectroscopic evaluation and classification of the normal, aging, and cataractous lens. *Ophthalmic Res* 8: 335-353, 1976
- 17) Bando M, Nakajima A, Satoh K. Coloration of human lens protein. *Exp Eye Res* 20: 489-492, 1975
- 18) Castineiras SG, Dillon J, Spector A. Non-tryptophan fluorescence associated with human lens protein; apparent complexity and isolation of bityrosine and anthranilic acid. *Exp Eye Res* 26: 461-476, 1978
- 19) Inoue A, Satoh K. Identification of a new fluorescent compound isolated from human lens insoluble protein fraction. *Bioorg Med Chem Lett* 3: 345-346, 1993
- 20) Dillon J, Spector A, Nakanishi K. Identification of  $\beta$  carbolines isolated from fluorescent human lens proteins. *Nature* 259: 422-423, 1976
- 21) van Heyningen R. Assay of fluorescent glucosides in the human lens. *Exp Eye Res* 15: 121-126, 1973
- 22) Inoue A, Satoh K. Identification of a fluorescent glucoside isolated from the protein-free extract of human lens. *Bioorg Med Chem Lett* 4: 2303-2306, 1994
- 23) 坂東正康. 紫外線と白内障. 眼科MOOK 45, 白内障診療ガイド (佐々木一之編), 第1版, 43-51頁, 金原出版, 東京, 1990
- 24) Bando M, Mikuni I, Obazawa H. Acceleration of calcium-induced aggregation of rat lens soluble protein by photosensitization with 8-methoxypsoralen and 3-hydroxy-L-kynurenine O- $\beta$ -glucoside. *Exp Eye Res* 34: 953-960, 1982
- 25) Dillon J, Wang R-H, Atherton SJ. Photochemical and photophysical studies on human lens constituents. *Photochem Photobiol* 52: 849-854, 1990
- 26) Bando M, Nakajima A, Satoh K. Spectrophotometric estimation of 3-OH L-kynurenine O- $\beta$ -glucoside in the human lens. *J Biochem* 89: 103-109, 1981
- 27) Wood AM, Truscott RJW. UV filters in human lenses: Tryptophan catabolism. *Exp Eye Res* 56: 317-325, 1993
- 28) Bessems GJH, Hoenders HJ. Distribution of aromatic and fluorescent compounds within single human lenses. *Exp Eye Res* 44: 817-824, 1987
- 29) 岩瀬 剛, 白尾悦子, 白尾 裕, 松川 茂, 福田龍二. ヒト褐色および非褐色白内障水晶体核部水溶性分画における遊離非トリプトファン蛍光物質の研究. *日眼会誌* 100: 369-375, 1996
- 30) Dillon J. Photolytic changes in lens proteins. *Curr Eye Res* 3: 145-150, 1984
- 31) Ferré J, Real MD, Ménsua JL, Jacobson KB. Xanthurenic acid 8-O- $\beta$ -D-glucoside, a novel tryptophan metabolite in eye-color mutants of *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem*: 7509-7514, 1985
- 32) Real MD, Ferré J. Biosynthesis of xanthurenic acid 8-O- $\beta$ -D-glucoside in *Drosophila*. Characterization of the xanthurenic acid: UDP-glucosyltransferase activity. *J Biol Chem* 265: 7407-7412, 1990
- 33) Wood AM, Truscott RJW. Ultraviolet filter compounds in human lenses: 3-hydroxykynurenine glucoside formation. *Vision Res* 34: 1369-1374, 1994
- 34) Malina HZ, Martin XD. Xanthurenic acid derivative formation in the lens is responsible for senile cataract in humans. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 234: 723-730, 1996
- 35) Malina HZ, Martin XD. 3-hydroxykynurenine transamination leads to the formation of the fluorescent substances in human lenses. *Eur J Ophthalmol* 6: 250-256, 1996
- 36) Siegel FP, Blake MI. Buffer effects in the nonenzymatic transamination of L-alanine and pyridoxal. *J Pharm Sci* 54: 155-156, 1965
- 37) Allegri G, De Antoni A, Costa C. Non-enzymatic transamination between pyridoxal-5-phosphate and kynurenines in the presence of zinc ions. *Ital J Biochem* 20: 139-142, 1971
- 38) Lou MF, Dickerson JE, Tung WH, Wolfe JK, Chylack LT. Correlation of nuclear color and opalescence with protein S-thiolation in human lenses. *Exp Eye Res* 68: 547-552, 1999
- 39) van Heyningen R. Photo-oxidation of lens proteins by sunlight in the presence of fluorescent derivatives of kynurenine, isolated from the human lens. *Exp Eye Res* 17: 137-147, 1973

**Identification of a Novel Fluorophore in Human Brunescant Lens Nucleus** Kanako Ando, Department of Ophthalmology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Jusen Med Soc., **110**, 370 — 380 (2001)

**Key words** Glucoside, Xanthurenic acid, Mass spectrometry, Fluorophore, Cataract

#### **Abstract**

To study the relevance of protein-unbound (free) fluorophores in human crystalline lenses to brunescant cataract formation, the contents of free fluorophores were compared between brunescant and non-brunescant cataractous lens nuclei. Although the contents of 3-hydroxykynurenine-O- $\beta$ -glucoside (3HK-Glc), kynurenine and  $\alpha$ -deamino-3-hydroxykynurenine-O- $\beta$ -glucoside (DHKN-Glc) did not differ between the brunescant and non-brunescant nuclei, an unknown fluorophore (FI-Glc) was exclusively increased in brunescant nuclei. Our earlier experiments revealed that an incubation of low-molecular weight fraction (MW<10,000) of the non-brunescant nuclei yielded a particular fluorophore (FI-X). This FI-X was considered to be identical with the FI-Glc because both substances, as well as their  $\beta$ -glucosidase digests, were inseparable by high-performance liquid chromatography (HPLC). FI-X and its aglycon were analyzed by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS). LC/MS results suggested that the MW of the FI-X was 367. Therefore, the MW of its aglycon was calculated to be 205. The retention time of xanthurenic acid (MW=205) was exactly the same as that of the aglycon of the FI-X. These results strongly suggest that the FI-X (=FI-Glc) is a glucoside of xanthurenic acid (XA-Glc). 3HK-Glc was considerably stable when incubated alone but was converted to a substance that was chromatographically identical with FI-Glc when incubated with pyridoxal-5'-phosphate (PLP). Although it remains possible that the FI-Glc (=XA-Glc) in brunescant nuclei is derived by some enzymatic pathway, the present results suggest another possibility; that the FI-Glc is derived from 3HK-Glc by a non-enzymatic pathway.