

増殖因子 IL-3 除去によって誘導される Baf-3 細胞の アポトーシスにおける Bcl-2 ファミリー蛋白質の役割

寧 月 宝

東京医科大学免疫学講座

【要旨】 リンパ球におけるアポトーシスはリンパ球レパトリーの形成、クローナルな増殖を示したリンパ球の退縮、ウィルス感染細胞の除去などに重要な役割を果たしている。IL-3 を除去すると、IL-3 依存的な増殖を示す B 前駆細胞株 Baf-3 には速やかにアポトーシスが誘導されることから、Baf-3 細胞は増殖因子除去によってもたらされるアポトーシス誘導機序を解析するモデルとして有用である。Baf-3 細胞を IL-3 非添加 RPMI-1640 培地で培養すると、時間依存的にミトコンドリア膜電位の低下およびアポトーシスが誘導された。ミトコンドリア膜電位およびアポトーシスは DiOC₆ および annexin V 染色を用いたフローサイトメーター法によって測定した。ウエスタンブロット法を用いて Bcl-2 ファミリータンパク質レベルを検討すると、アポトーシス促進因子 Bax 発現レベルの亢進およびアポトーシス抑制因子 Bcl-x_L 発現レベルの低下が認められた。IL-3 除去によって誘導されるアポトーシスに対する Bcl-x_L の役割を検討するために、Baf-3 細胞株に HA-Bcl-x_L 発現ベクターをトランスフェクトし、Bcl-x_L 高発現 Baf-3 細胞株を樹立した。HA-Bcl-x_L 高発現 Baf-3 細胞株は IL-3 除去によってもたらされるアポトーシスに抵抗性を示したことから、Bcl-x_L が増殖因子除去誘導性アポトーシスを抑制していることが明らかとなった。以上より、増殖因子 IL-3 除去によって Bax/Bcl-x_L 割合が上昇し、この割合の変化がミトコンドリア膜電位の低下およびアポトーシス誘導に繋がると推測される。

はじめに

免疫系は無数ともいえる微生物を有効に排除するために、リンパ球成熟過程で多種類のリンパ球からなるリンパ球集団を準備した。この集団は自己には反応しないが、微生物には反応できる。予め沢山のリンパ球を準備したため、個々の微生物に反応できるリンパ球の数は極めて少ない。このため、微生物が侵入したあと、リンパ球クローンの増殖・拡大がおこる。感染局所における適切なシグナルによって、リンパ球はエフェクター細胞へと分化し、異物の排除を行う。排除が完了すると、リンパ球クローンの縮小がおこり、感染前の状態にもどる¹⁾。このリンパ球の縮小はリンパ

球増殖因子の欠乏によるアポトーシスを含む複数の機序によって調節されている。増殖因子 IL-3 依存的に増殖する Baf-3 細胞は増殖因子除去によって誘導されるアポトーシス誘導機序を解析するモデルとして利用されている²⁾。

アポトーシス誘導は Bcl-2 ファミリータンパク質、NF- κ B, Akt などを含む複数の因子のバランスによって決定されていると考えられている³⁻⁶⁾。細胞増殖因子は Akt キナーゼ、NF- κ Bなどを介して細胞生存・増殖を促しており、これらの因子が欠乏するとアポトーシスに陥る⁵⁾⁶⁾ ことなどが知られているが、その作用機序については不明の点も多い。Bcl-2 ファミリータンパク質はアポトーシスを促進する分子 (Bax, Bak な

2006年10月11日受付、2006年10月19日受理

キーワード: Baf-3細胞、アポトーシス、Bax、Bcl-x_L

(別冊請求先: 〒160-8402 東京都新宿区新宿6-1-1 東京医科大学免疫学講座 寧 月宝)

ど)、アポトーシスを抑制する分子 (Bcl-2, Bcl-x_L など)、および BH-3 単独蛋白質から成り立っている³⁴⁾。外来性 Bcl-2 を高発現させた Bcl-2 トランスジェニックマウスではアポトーシスが阻害される⁷⁾。また、アポトーシス促進因子 Bax あるいは Bak を欠損させたマウスでもアポトーシスが阻害され⁸⁾⁹⁾、両者を欠損させたマウスではさらにその程度が上昇している⁹⁾¹⁰⁾。Bcl-2 ファミリータンパク質はミトコンドリア機能を介してアポトーシスを調節しているが、どのようにして Bcl-2 ファミリー蛋白質の機能が調節されているかについては未だ十分に解析されていない。

今回、私は IL-3 依存性プロ B 細胞株 Baf-3 細胞株を用いて増殖因子除去によって誘導されるアポトーシス誘導機構を検討し、IL-3 除去によって Baf-3 細胞には時間依存的なアポトーシスが誘導され、この誘導には Bcl-2 ファミリー蛋白質の変化が関わっていることを明らかにした。これらの事実は増殖因子の除去によるアポトーシス誘導機序の解明、さらに免疫制御機構の解明に寄与するであろう。

研究材料および方法

1. 細胞株および細胞培養

B 前駆細胞株 Baf-3 は RPMI-1640 培地 (RPMI-1640、10% 牛胎児血清、50 μM 2-メルカプトエタノール、2 mM グルタミン、50 μg/ml カナマイシン) に IL-3 あるいは IL-3 含有 WEHI-3 培養上清 (10% v/v) を添加したものをを用いて維持した。Bcl-x_L 高発現 Baf-3 細胞株は Baf-3 細胞株に Bcl-x_L 発現ベクターをトランスフェクトし¹¹⁾、G418 含有 RPMI-1640 選択培地を用いてトランスフォーマントを得た後、限界希釈法によってクローンを樹立した。

2. ミトコンドリア膜電位およびアポトーシスの測定

野生型あるいは Bcl-x_L 高発現 Baf-3 細胞株を培地で 2 回洗浄することによって IL-3 を除去した後、IL-3 添加あるいは非添加 RPMI-1640 培地で種々の時間培養した。培地で洗浄後、以前に報告した方法に従って¹²⁾¹³⁾、ミトコンドリア膜電位および annexin V 陽性細胞を測定した。すなわち、Baf-3 細胞を 40 nM DiOC₆ で標識し、フローサイトメーターを用いてミトコンドリア膜電位を測定した。アポトーシス細胞の測定は Annexin-V-Cy5 アポトーシス検出キットを用いた。Baf-3 細胞 2×10⁵ 個をバッファー (結合バッファー 0.5 ml プラス Cy5 結合 Annexin V 蛋白質 5 μl)

に浮遊させ、室温で 5 分間インキュベートした後、フローサイトメーターを用いて Annexin-V 陽性細胞を測定した。

3. ウェスタンブロット法

細胞を可溶化剤 (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% Triton X, 10 μg/ml ロイペプチン、1 mM PMSF, 10 μg/ml アプロチニン) で可溶化し、サンプルを作製した。以前に報告した方法に従って¹²⁾、SDS-PAGE で分画した後、PVDF 膜に転写した。洗浄後、1 次抗体 (抗 Bax、抗 Bcl-2、抗 Bcl-x_L、抗 actin) で 18~24 時間インキュベートし、その後 2 次抗体 (ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG) と 1 時間インキュベートした。洗浄後、ECL 法を用いて現像した。

4. 統計解析

データは平均±SD で表現されている。Student's *t*-test を用いて統計処理を行い、*p*<0.05 の差を有意であると判定した。

結 果

1. IL-3 除去によって Baf-3 細胞には時間依存的なミトコンドリア膜電位の低下が観察される

ミトコンドリア膜電位の低下はアポトーシス誘導と密接な関連性があることが知られている³⁴⁾。IL-3 添加培地で維持されている Baf-3 細胞を培地で 2 回洗浄後、IL-3 除去あるいは IL-3 添加 RPMI-1640 培地で培養し、開始後 12 時間、18 時間、24 時間、および 48 時間目に回収し、フローサイトメーターを用いてミトコンドリア膜電位を測定した。ミトコンドリア膜電位は DiOC₆ でラベルし、フローサイトメーターを用いて測定した。IL-3 除去培地で培養すると、開始後 24 時間、48 時間ではそれぞれ約 40%、80% の細胞がミトコンドリア膜電位の低下を示した (Fig. 1)。一方、IL-3 添加培地で培養した場合には、開始後 48 時間まで有意のミトコンドリア膜電位の低下は観察されなかった。これらの事実は増殖因子 IL-3 の除去によって Baf-3 細胞にはミトコンドリア膜電位の低下が誘導されるということを示唆している。

2. IL-3 除去によって Baf-3 細胞には時間依存的なアポトーシス誘導が認められる

アポトーシス誘導がおこると核の断片化、アポトーシス小体などが観察されるが、アポトーシスの初期過程には phosphatidyl-serine の細胞外膜への反転が認められ、annexin V 染色を用いてこの初期ステップを観察することが可能である¹⁴⁾。Fig. 1 と同様な方法を

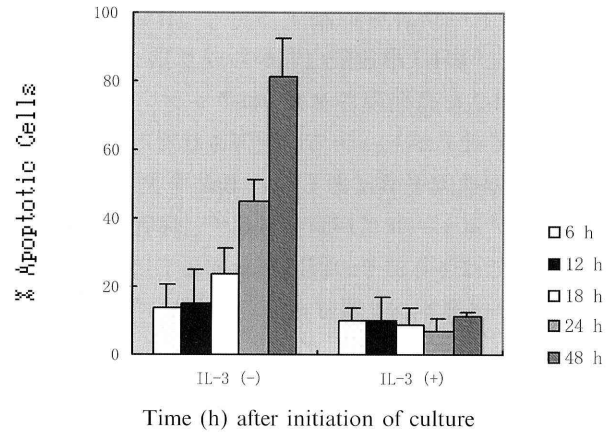
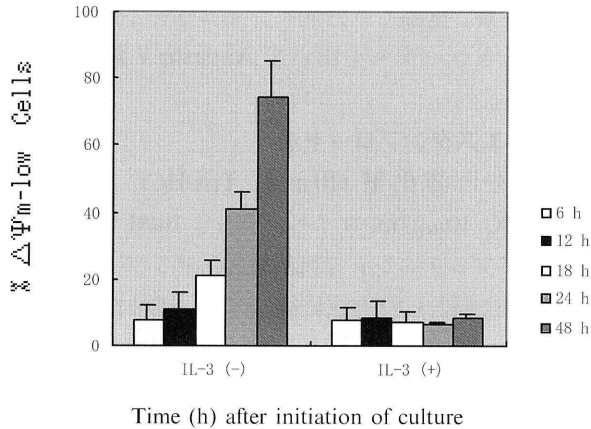


Fig. 1 Loss of mitochondrial membrane potential upon IL-3 withdrawal in Baf-3 cells. Baf-3 cells were cultured with or without IL-3 for the indicated times, and then assessed in terms of mitochondrial membrane potential using the DiOC₆ staining method. The results are expressed as percentage of cells with low mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_{m-low}$) and are expressed as the mean \pm SD from several independent experiments.

Fig. 2 Induction of apoptosis upon IL-3 withdrawal in Baf-3 cells. Baf-3 cells were cultured as described in Fig. 1, and then assessed by the annexin V staining method. The results are expressed as the mean \pm SD from several independent experiments.

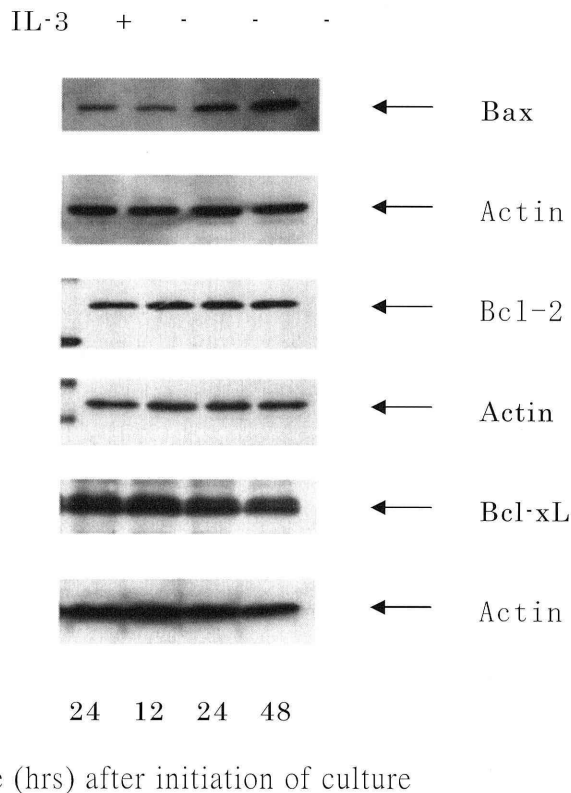


Fig. 3 Increase in the ratio of Bax to Bcl-x_L upon IL-3 withdrawal in Baf-3 cells. Cells were cultured as described in Fig. 1 and then assessed by Western blotting using specific antibodies to Bcl-2 family proteins.

用いて培養すると、IL-3 除去後 24 時間目に約 40%、48 時間目には約 80% の細胞が annexin V 陽性であった (Fig. 2)。対照として IL-3 添加培地を用いた場合には、有意の annexin V 陽性細胞が観察されなかった。これ

らの事実から増殖因子 IL-3 を除去すると、Baf-3 細胞は速やかにアポトーシスに陥ることが示された。

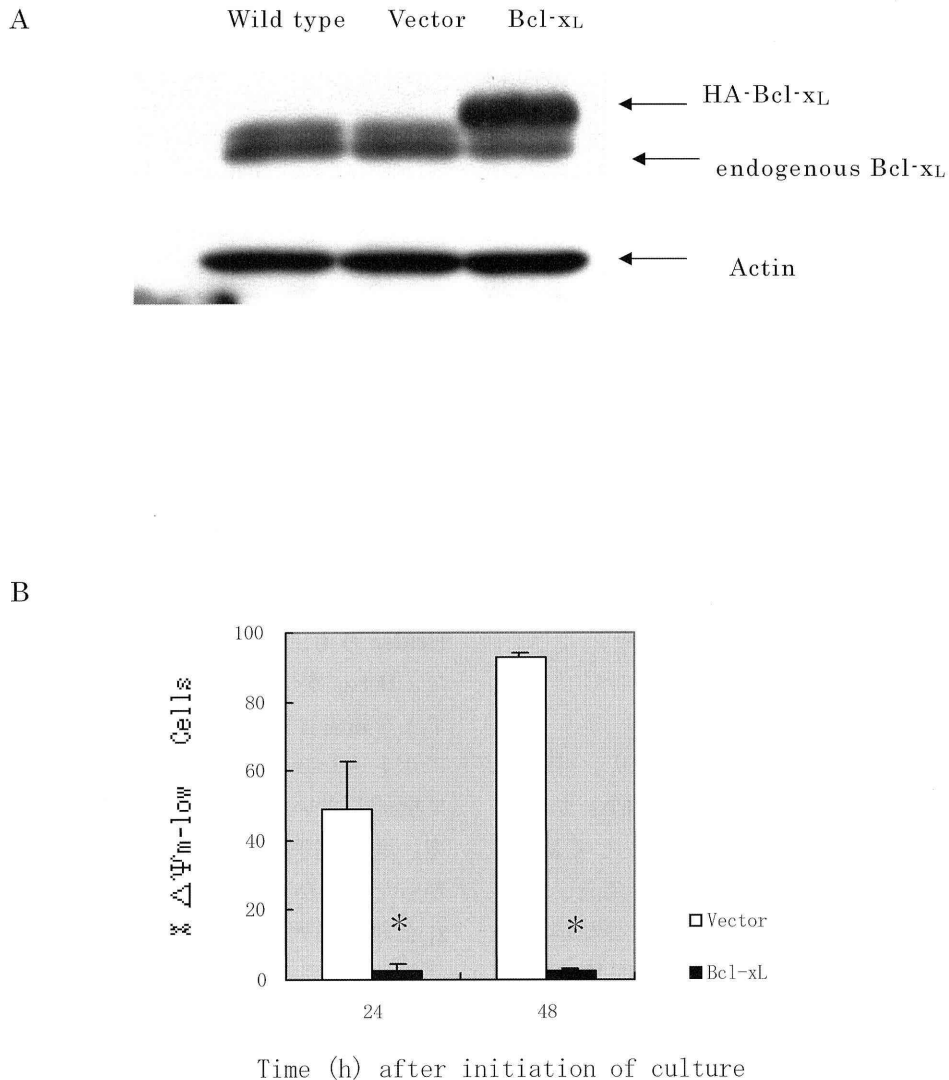


Fig. 4 Resistance to apoptosis induction in HA-Bcl-x_L-overexpressing Baf-3 cell line upon IL-3 withdrawal. Baf-3 cells were transfected with expression vector for HA-Bcl-x_L or control vector alone and then cultured with selection medium to obtain transformant (A). The Baf-3 cells overexpressing Bcl-x_L or control vector alone were cultured for 24 h or 48 h, followed by assay for mitochondrial membrane potential (B). The results are expressed as the mean \pm SD from several independent experiments. *Significantly different from control vector alone.

3. IL-3除去によってBaf-3細胞にはBax発現が増強される

Bcl-2ファミリータンパク質がミトコンドリア機能の制御を介してアポトーシス誘導を調節していることが種々の系で報告されている³⁴⁾。Fig. 1と同様な方法を用いてBaf-3細胞を培養し、培養後12時間、24時間、および48時間目のBcl-2ファミリータンパク質レベルをウエスタンブロット法を用いて検討した。IL-3除去後24時間および48時間目にアポトーシス促進因子Bax発現レベルが亢進したが、アポトーシス抑制因子Bcl-x_Lレベルは低下を示した(Fig. 3)。一方、Bcl-2レベルには変化が認められなかった。これらの事実から、IL-3除去によってアポトーシス促進因子Bax発

現レベルの上昇と抑制因子Bcl-x_L発現レベルの低下が誘導されることが示された。

4. Bcl-x_L高発現Baf-3はIL-3除去によって誘導されるアポトーシスに抵抗性を示す

IL-3除去によってもたらされるBcl-x_Lレベルの低下がアポトーシス誘導に関わっているか否かを検討するために、Bcl-x_L高発現Baf-3細胞を作製し、アポトーシス感受性を調べた。Bcl-x_L発現ベクターおよびコントロールベクターを用いてBaf-3細胞へ移入した。内在性Bcl-x_Lと容易に区別できるようにHAタグを連結したBcl-x_Lを用いた。G418選択培地で培養し、G418抵抗性を示す細胞株を得、Bcl-x_L発現レベルを抗Bcl-x_L抗体を用いたウエスタンブロット法を用い

て検討した。HA-Bcl-x_L を移入された細胞には内在性 Bcl-x_L とともに移入した外来性 HA-Bcl-x_L が高発現されていた (Fig. 4A)。一方、野生型 Baf-3 細胞およびコントロールベクターを移入された Baf-3 細胞では内在性 Bcl-x_L のみが認められた。これらの事実から HA-Bcl-x_L 高発現 Baf-3 細胞が樹立されたことになる。

この HA-Bcl-x_L 高発現 Baf-3 細胞が増殖因子除去誘導性アポトーシスに抵抗性を示すか否かを検討した。Baf-3 高発現細胞あるいはコントロール細胞を IL-3 除去培地で 24 時間あるいは 48 時間培養し、DiOC₆ を用いてミトコンドリア膜電位を測定した。コントロール細胞ではミトコンドリア膜電位の低下が観察されたが、HA-Bcl-x_L 高発現細胞では膜電位の低下は著明に抑制された (Fig. 4B)。これらの事実は Bcl-x_L が増殖因子除去によって誘導されるアポトーシスを抑制しているということを示唆している。

考 察

リンパ球に観察されるアポトーシスはリンパ球レパトリの形成、リンパ球クローンの縮小、ウィルス感染細胞の除去などに重要な役割を果たしており、このアポトーシス誘導の調節機構が破綻すると、リンパ球増殖、慢性炎症、自己免疫疾患などにつながる事が報告されている³¹⁾。今回、私は増殖因子 IL-3 依存的な増殖を示す B 前駆細胞株 Baf-3 を用いて²⁾、増殖因子欠如によってもたらされるアポトーシス誘導機序を検討した。

種々の細胞系において、ミトコンドリア機能がアポトーシスのコミットメントを制御していると思われている³²⁾。増殖因子 IL-3 を除去すると、時間依存的なミトコンドリア膜電位の低下が観察された。さらに、ミトコンドリア膜電位と深いつながりがあるアポトーシスもほぼ同じ時間経過で誘導された。ミトコンドリア膜電位の低下および annexin V 陽性細胞はアポトーシス誘導の初期過程を表しているが、この時間経過とほぼ一致して Bcl-2 ファミリー蛋白質の変動が観察された。

ミトコンドリア機能は Bcl-2 を含む複数の蛋白質によって調節されていると思われている³³⁾。Bcl-2 ファミリー蛋白質はアポトーシス促進因子 (Bax, Bak)、アポトーシス抑制因子 (Bcl-2, Bcl-x_L)、および BH3 単独蛋白質から構成されている³⁴⁾。IL-3 除去によって、アポトーシス抑制因子 Bcl-x_L 発現の低下およびアポトーシス促進因子 Bax レベルの増強が観察さ

れたことから、Bax/Bcl-x_L 割合の増加がアポトーシス誘導・促進に関わっていると思われる。これらの Bcl-2 ファミリー蛋白質がどのようにして、アポトーシスのコミットメントに関わっているかという点については、未だ十分に解明されていないが、*in vitro* でチトクローム c などの低分子の遊離に十分な大きさの Bax チャンネルが形成され、アポトーシスの誘導・促進されるという報告もある¹⁵⁾¹⁶⁾。また、Bax がミトコンドリア外膜に存在しているチャンネル (permeability transition ポア) との相互作用を介して機能している可能性もあるが¹⁷⁾、今後の検討が待たれる。

Bcl-x_L を高発現させた Baf-3 細胞株では IL-3 誘導性アポトーシスに抵抗性を示したことから、B 前駆細胞においても Bcl-x_L はアポトーシス誘導に対して抑制的に作用していることが明らかとなった。Vander Heiden からも、増殖因子依存性細胞株 FL5.12 を用いて、Bcl-x_L がアポトーシス誘導に抵抗性を示すということを報告している¹⁸⁾。これらの事実は Bcl-x_L 分子がアポトーシス促進分子の Bax のスカベンジャーとして機能しているという考え方を支持している¹⁹⁾。一方、増殖因子除去によって Bcl-2 レベルは変動しなかったことから、アポトーシス抑制分子 Bcl-2 と Bcl-x_L は細胞系列あるいは細胞成熟段階によって使い分けられているのかもしれない。

本研究では、IL-3 除去ストレスがどのようにして Bax を活性化し、ミトコンドリア膜電位の低下をもたらすかについて明らかにできなかったが、リンパ球抗原受容体を介する B 細胞アポトーシスでは、Bax は主に細胞質に存在しており、アポトーシスシグナルを受け取ると、ミトコンドリアへと移行する。この Bax の移行には持続的な JNK 活性化が関わっていることが報告されている²⁰⁾。つまり、JNK 活性化によって Bax と結合している 14-3-3 蛋白質がリン酸化されると、Bax が 14-3-3 蛋白質から遊離し、ミトコンドリアへ移行を介してミトコンドリア膜電位の低下が誘導されるというシナリオが想定されている。

IL-3 依存性細胞株では IL-3 刺激によって Akt, NF- κ B が活性化され、細胞増殖・細胞増殖が維持されているが、IL-3 が欠如するとこれらの活性化が抑制され、アポトーシスに至ることが知られている²¹⁾。Akt は PI-3 キナーゼによって活性化される。PI-3 キナーゼ/Akt あるいは NF- κ B 活性化の抑制と Bax/Bcl-x_L 割合の増加はどのような関連性があるのだろうか。これらの事象を介しているのは c-Jun N-terminal kinase

(JNK) を含む mitogen-activated protein kinases (MAPKs) であるという仮説を立てて、研究を進めている。

本研究では、増殖因子欠乏によって誘導されるアポトーシスには Bax/Bcl-x_L 割合の上昇およびミトコンドリア膜電位の低下が関わっていることを明らかにした。これらの事実はアポトーシス誘導機序の解明、さらに自己免疫疾患の原因の解明に寄与するであろう。

結 論

細胞増殖因子が欠如するとアポトーシスが誘導されるが、その機序として Bcl-2 ファミリータンパク質に属している Bax と Bcl-x_L の比率の増加、ミトコンドリア膜電位の低下、最後にアポトーシス誘導という経路が示唆された。これらの結果はアポトーシス誘導の制御を介した免疫調節に有用な情報を与えるであろう。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、終始御指導くださいました水口 純一郎教授に深く感謝申し上げます、また、ご協力いただきました免疫教室の皆様と女子栄養大学免疫検査研究室の林 修教授に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Rathmell JC, Thompson CB: Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* **109** (Suppl): S97-107, 2002
- 2) Rodriguez-Tarduchy G, Collins M, Lopez-Rivas A: Regulation of apoptosis in interleukin-3-dependent hemopoietic cells by interleukin-3 and calcium ionophores. *EMBO J* **9**: 2997-3002, 1990
- 3) Chao DT, Korsmeyer SJ: BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* **16**: 395-419, 1998
- 4) Reed JC: Bcl-2 family proteins. *Oncogene* **17**: 3225-3236, 1998
- 5) Hammerman PS, Fox CJ, Thompson CB: Beginnings of a signal-transduction pathway for bioenergetic control of cell survival. *Trends Biochem Sci* **29**: 586-592, 2004
- 6) Claudio E, Brown K, Siebenlist U: NF-kappaB guides the survival and differentiation of developing lymphocytes. *Cell Death Differ* **13**: 697-701, 2006
- 7) Chao DT, Linette GP, Boise LH, White LS, Thompson CB, Korsmeyer SJ: Bcl-XL and Bcl-2 repress a common pathway of cell death. *J Exp Med* **182**: 821-828, 1995
- 8) Knudson CM, Tung KS, Tourtellotte WG, Brown GA, Korsmeyer SJ: Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* **270**: 96-99, 1995
- 9) Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng VM, Adelman DM, Simon MC, Ma A, Golden JA, Evan G, Korsmeyer SJ, MacGregor GR, Thompson CB: The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* **6**: 1389-1399, 2000
- 10) Rathmell JC, Lindsten T, Zong WX, Cinalli RM, Thompson CB: Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. *Nat Immunol* **3**: 932-939, 2002
- 11) Noutomi T, Chiba H, Itoh M, Toyota H, Mizuguchi J: Bcl-x(L) confers multi-drug resistance in several squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol* **38**: 41-48, 2002
- 12) Takada E, Shimo K, Hata K, Abiake M, Mukai Y, Moriyama M, Heasley L, Mizuguchi J: Interferon-beta-induced activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase mediates apoptosis through up-regulation of CD95 in CH31 B lymphoma cells. *Exp Cell Res* **304**: 518-530, 2005
- 13) Hotta T, Suzuki H, Nagai S, Yamamoto K, Imakiire A, Takada E, Itoh M, Mizuguchi J: Chemotherapeutic agents sensitize sarcoma cell lines to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced caspase-8 activation, apoptosis and loss of mitochondrial membrane potential. *J Orthopaed Res* **21**: 949-957, 2003
- 14) Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH: Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* **84**: 1415-1420, 1994
- 15) Saito M, Korsmeyer SJ, Schlesinger PH: BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat Cell Biol* **2**: 553-555, 2000
- 16) Schlesinger PH, Gross A, Yin XM, Yamamoto K, Saito M, Waksman G, Korsmeyer SJ: Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 11357-11362, 1997
- 17) Pastorino JG, Tafani M, Rothman RJ, Marcinekiciute A, Hoek JB, Farber JL, Marcinekiciute A: Functional consequences of the sustained or transient activation by Bax of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* **274**: 31734-31739, 1999
- 18) Vander Heiden MG, Chandel NS, Schumacker PT,

- Thompson CB: Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol Cell* **3**: 159-167, 1999
- 19) Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ: Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**: 609-619, 1993
- 20) Takada E, Hata K, Mizuguchi J: Requirement for JNK-dependent upregulation of BimL in anti-IgM-induced apoptosis in murine B lymphoma cell lines WEHI-231 and CH31. *Exp Cell Res* in press.
- 21) Plas DR, Talapatra S, Edinger AL, Rathmell JC, Thompson CB: Akt and Bcl-xL promote growth factor-independent survival through distinct effects on mitochondrial physiology. *J Biol Chem* **276**: 12041-12048, 2001

Role of Bcl-2 family proteins in the apoptosis induced by growth factor withdrawal of IL-3-dependent cell line Baf-3

Yuebao NING

Department of Immunology, Tokyo Medical University

Abstract

Apoptosis of lymphocytes plays a crucial role for generation of lymphocyte repertoire, clonal contraction, and elimination of virus-infected cells. Since IL-3-dependent pro-B cell line Baf-3 results in rapid induction of apoptotic cell death upon IL-3 withdrawal, it would be very valuable for analysis of apoptosis induction induced by growth factor deprivation. Baf-3 cells underwent loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and apoptosis in a time-dependent manner when they were cultured in the RPMI-1640 medium without IL-3. Induction of apoptosis and $\Delta\Psi_m$ was determined by DiOC₆ and annexin V staining method using flow cytometer, respectively. Deprivation of IL-3 induced upregulation of proapoptotic molecule Bax, in conjunction with slight down-regulation of anti-apoptotic molecule Bcl-x_L, which was assessed by Western blotting. To analyze the role of Bcl-x_L in induction of apoptosis upon growth factor withdrawal, Bcl-x_L-overexpressing Baf-3 cell lines were established by transfecting Baf-3 cells with HA-Bcl-x_L expression vector. The HA-Bcl-x_L-overexpressing Baf-3 cells showed a great resistance to IL-3-deprivation, compared with vector control cells. Together, IL-3 deprivation in IL-3-dependent cell line Baf-3 induces an increase in the ratio of Bax to Bcl-x_L, leading to loss of $\Delta\Psi_m$, and finally apoptosis.

<Key words> Baf-3 cells, apoptosis, Bax, Bcl-x_L
