

2008年9月22日  
独立行政法人 理化学研究所

## さまざまな「体内時計」が生まれる仕組みを解明

- 「昼」と「夜」ができる仕組みなど、時を刻む仕組みが明らかに -

バクテリアをはじめショウジョウバエ、マウス、人など、生物には、リズムを刻む体内時計が働いています。睡眠と目覚め、体内ホルモンの調節などの生理機能は、このリズムに合わせて営みを行っています。

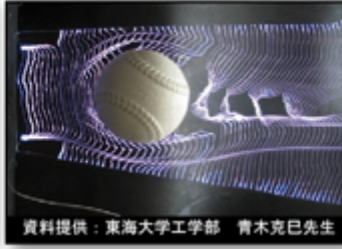
体内時計には、朝・昼・夜の基本的な時刻に遺伝子を発現させる3つの制御DNA配列と、約20個の時計遺伝子（転写制御因子を含む）が、時計の部品として備わっていることがわかっています。さらに、これら部品が互いに制御しあう様子を表した複雑な「設計図」（転写制御ネットワーク）も提示されてきました。しかし、この設計図どおりに、部品が従い、正確に時を刻んでいるかは証明できていません。

発生・再生科学総合研究センターシステムバイオロジー研究チームと機能ゲノミクスユニットは、培養細胞中に人工的な転写制御ネットワークを構築することで生命システムの理解を試みる新たな研究戦略を実現しました。細胞を用いた「物理的シミュレーション」ともいえるこの研究戦略は、「リアル」な自然の生命現象と「バーチャル」な計算機実験との架け橋となりえます。実際に研究チームは、体内時計に似せた人工の転写ネットワークを細胞内に構築し、「昼」と「夜」の転写出力を再現することに成功し、「昼」と「夜」の設計図が完全であることを証明しました。さらに、体内時計の転写制御ネットワークが、さまざまな時刻（位相）や強さ（振幅）を持つ転写出力を作り出す設計原理を明らかにしました。体内時計の理解を大きく前進させるこの成果は、リズム障害などの効果的診断や治療の開発につながると期待されます。

リアル  
(実際の投球)

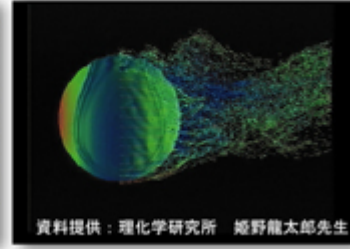


物理的シミュレーション  
(風洞実験：火花追跡法)



資料提供：東海大学工学部 青木克巳先生

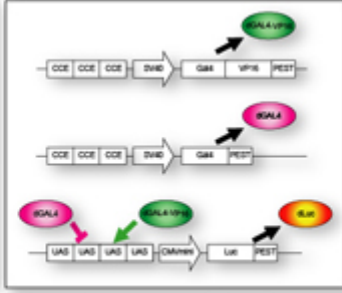
バーチャル  
(計算機実験)



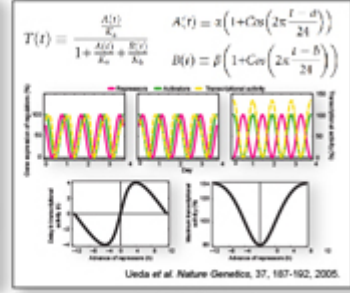
資料提供：理化学研究所 姫野龍太郎先生



自然の生命現象



細胞内の再構成実験



計算機実験

図 体内時計のネットワークを人工的に細胞内に構築し  
さまざまな体内時刻ができる仕組みを解明

2008年9月22日  
独立行政法人 理化学研究所

## さまざまな「体内時間」が生まれる仕組みを解明

- 「昼」と「夜」ができるメカニズムなど、時を刻む仕組みが明らかに -

### ◇ポイント◇

- ・人工ネットワークを細胞内に構築する、生命システムの理解に有効な研究戦略を実現
- ・実際に体内時計のネットワークを人工的に構築、「昼」と「夜」ができる仕組みを解明
- ・さまざまな体内時間を作り出す設計原理を証明、治療・診断への応用に期待

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、培養細胞中に体内時計に似せた人工ネットワークを構築することで、生体内で現れる「昼」と「夜」の転写出力を再現し、体内時計の遺伝子ネットワークの設計原理を明らかにしました。理研発生・再生科学総合研究センター（竹市雅俊センター長）システムバイオロジー研究チームの上田泰己チームリーダー（機能ゲノミクスユニットユニットリーダー兼務）、鶴飼（蓼沼）磨貴テクニカルスタッフ I および機能ゲノミクスユニットの粕川雄也研究員らを中心とした研究グループの成果です。

これまでに研究グループは、哺乳類の体内時計システムは、3つの制御DNA配列（「朝」、「昼」、「夜」の基本時刻に遺伝子を発現させる働き）と約20個の時計遺伝子（転写制御因子を含む）という「部品」で成り立ち、これらが互いに制御し合うことで24時間周期が作られるという、複雑な「設計図」（転写制御ネットワーク）を明らかにしてきました。しかし、この設計図で完全に体内時計システムが構築され得るのかは、まだ証明されていません。本研究では、人工的なタンパク質を体内時計の部品（人工転写制御因子）に見立て、哺乳類の培養細胞中に体内時計に似せた人工転写制御ネットワークを組み立てることで、体内時計の物理的シミュレーション<sup>\*1</sup>を試みました。この手法により、人工転写制御因子をさまざまな時刻に発現させ、人工転写制御因子だけが作用するようにしたプロモーター<sup>\*2</sup>の転写出力の時刻を解析した結果、体内時計の基本時刻である「昼」と「夜」を作る設計図の完全性を証明しました。研究グループは、この実験手法を応用し、さまざまな時刻を生み出す設計原理の証明にも成功しました。この設計原理は既知の時計遺伝子のプロモーターの振る舞いを説明するだけでなく、予測した時刻に機能する人工プロモーターを設計することにも応用が可能

です。

体内時計は、ヒトの健康にもかかわる重要な生体システムです。今回、体内時計システムの理解が一步進んだことで、リズム障害などの効果的な診断や治療法の開発へつながることが期待されます。また、今回構築した実験手法は、体内時計システムのような動的で複雑な生命現象の解析において、有用な戦略となります。

この研究は、文部科学省科学研究費補助金「ゲノム特定領域研究（生命システム情報）」の一環として、また上原記念生命科学財団の助成により進められました。本研究成果は、『*Nature Cell Biology*』（10月号）に掲載されるに先立ち、オンライン版に近く掲載される予定です。

## 1. 背景

体内時計システムは、バクテリア、ショウジョウバエ、マウス、ヒトなど多くの生物種に存在し、哺乳類の場合には、睡眠・覚醒、血圧・体温、ホルモン分泌といった広範な生理機能に影響を与えていると考えられています。研究グループはこれまでに、定量的で包括的な研究を進め、哺乳類の体内時計システムの構成要素として、3つのゲノム DNA 上の制御 DNA 配列（朝配列：E/E'box、昼配列：D-box、夜配列：RRE）と、それらと発現を互いに制御しあっている約 20 個の時計遺伝子（転写制御因子を含む）を同定してきました。これらの遺伝子は、24 時間周期で発現量を変動させています。発現量がピークを迎える時間は、各遺伝子のプロモーター領域にある制御 DNA 配列により規定されています。研究グループはさらに、制御 DNA 配列と時計遺伝子（転写制御因子）がお互いの制御を複雑に絡み合わせた、体内時計システムの転写制御ネットワークの「設計図」（図 1）も作成してきました。しかし、この設計図は、互いの制御関係を示したものであり、設計図に沿うことで、本当に各遺伝子が本来の時間に発現することができるのか、つまり、この設計図で完全に動的な体内時計システムが構築できるのかどうかは、いまだに証明できていませんでした。そこで、体内時計システムのような複雑な転写制御ネットワークの設計原理を理解するために、「再構成」による研究手法を開発し、設計図の詳細な解析を行いました。

哺乳類の体内時計システムのような、動的で複雑なシステムを完全に理解するためには、システムにかかわる因子の「同定」と「機能解析」のほかに、「再構成」というアプローチが重要です。例えば、目覚まし時計がどのような仕組みで動いているのかを知るために、目覚まし時計を分解して、ネジや歯車、文字盤、針など、多くの部品を見つけることが「同定」で、見付けた部品がどのような働きをするのか調べるのが「機能解析」です。そして、もう 1 つ重要なことは、取り出した部品を元に戻し、もう一度目覚まし時計を動かしてみる「再構成」です。目覚まし時計全体や部品の 1 つ 1 つをよく観察して設計原理を理解し、元通りに戻すことができると、目覚まし時計は再び動き出します。設計原理を少しでも勘違いして理解していると、目覚まし時計は動かなかったり、逆回転をしたり、遅れたりするでしょう。対象を深く理解しなければ、「再構成」は難しいのです。しかし、十分に理解すれば、部品をアレンジして、オリジナルの目覚まし時計を作ることでもあります。一方で、上手に組み立てたつもりでも、目覚まし時計がうまく動かなかった場合、いまだ理解していない機構があることに気付くこともできます。

体内時計システムの転写制御ネットワークの再構成の場合も同様です。これまでにさまざまな時計遺伝子が同定され、機能が研究されてきましたが、まだ組み立て直す試みはなされていません。哺乳類の体内時計システムの転写制御ネットワークは複雑（図 1）であるため、研究グループは、人工的にアレンジした部品を使い、最小単位の制御を切り取って「再構成」することにしました。

## 2. 研究手法

研究グループはこれまでに、哺乳類の培養細胞系で体内時計システムの観察手法を構築しています（*Nature*, Ueda *et al* 2002）。今回の研究では、このシステムを発展させ、哺乳類培養細胞・人工転写制御因子（人工転写活性化因子および人工転

写不活性化因子)・人工標的プロモーター (転写出力のモニターとして使用) から成る人工転写制御ネットワークの解析系を立ち上げました。

体内時計システムの転写制御ネットワークは、時計遺伝子 (転写制御因子) と制御DNA配列を含む標的遺伝子のプロモーター (標的プロモーター) から成る基本セットに分解して考えることができます。この基本セットをたくさん重ね合わせると、図1のような複雑なネットワークになります。研究グループは、最小単位の基本セットを人工的に組み立て (図2)、転写制御ネットワークの解析を行いました。

まず、酵母とウィルスの転写因子を組み合わせ、哺乳類には存在しない人工的な転写制御因子 (人工転写制御因子) を作りました (図2)。具体的には、酵母の転写制御因子 (GAL4) を人工転写不活性化因子とし、GAL4にウィルスの転写活性化領域 (VP16) を融合させたもの (GAL4-VP16) を人工転写活性化因子としました。これらの人工転写制御因子は、体内時計の基本時刻での発現を規定する3つの制御DNA配列 (E'-box・D-box・RRE) により、「朝」・「昼」・「夜」それぞれの時間に発現する仕組みにしました。また、人工標的プロモーターには、人工転写制御因子のGAL4部分が結合する配列 (UAS) を配置し、人工転写制御因子が働きかけられるようにしました。人工標的プロモーターが活性化すると、下流の遺伝子産物 (蛍光タンパク質を分解しやすくしたdLucタンパク質) が作られます。この産物の活性量を人工標的プロモーターの転写出力としてモニタリングすることで、人工転写制御因子が働く時刻と、それによって人工標的プロモーターが活性化する時刻の関係を知ることができます。研究グループは、この「再構成実験」による検証を「物理的シミュレーション」 (図3) と位置づけ、人工転写制御因子を発現させる時刻の組み合わせをさまざまに変え、人工標的プロモーターの転写出力が示す時刻を観察しました。

さらに、実験から得られた人工転写制御因子が働く時刻と人工標的プロモーターが活性化する時刻や、それぞれの振幅<sup>\*3</sup>の情報をコンピュータ上で解析し、体内時計システムの転写制御ネットワークの設計図を説明する法則を探索しました。

### 3. 研究成果

#### (1) 設計図から予測されていた制御機構を初めて証明

研究グループは、哺乳類培養細胞中に、体内時計システムの転写制御ネットワークを模した人工転写制御ネットワークを構築しました (図2)。人工転写活性化因子と人工転写不活性化因子を、それぞれさまざまな時刻 (朝・昼・夜) で発現するような仕掛けにし、人工標的プロモーターに働きかけることで、転写出力 (dLucの発現) を調節しました。そして、発現したdLucの活性を観察し、転写出力のピーク時刻を解析しました。この物理的シミュレーションの結果、①朝に発現する転写活性化因子と夜に発現する転写不活性化因子が、昼の転写出力を再現するのに必要な最小の条件であること (図4a)、②昼に発現する転写活性化因子と朝に発現する転写不活性化因子が、夜の転写出力を再現するための必要最小限の条件であること (図4b)、を明らかにしました。これらは、図1の設計図から予測されていた構造による制御と一致し、本研究により初めて証明できました。

## (2) 転写出力の制御の法則の発見と証明

さらに、「朝」・「昼」・「夜」の3つの基本時刻の転写制御因子を単純に組み合わせるだけで、明け方、午後、夕方、深夜などのさまざまな時刻に発現のピークを示す転写出力を生み出すことが可能であるとわかりました。哺乳類の体内では、多くの遺伝子の発現が24時間周期で振動し、それぞれの発現が一番高くなる時刻はさまざまです。言い換えれば、時間が進むにつれ、次々にいろいろな遺伝子が発現のピークを迎え、生体内では、一見連続的な転写出力が創りだされています。今回の研究でさまざまな転写出力を創出できたことは、生体内に観察される現象の理解を助ける成果となります。

この詳細な解析を進めるために、研究グループは、インフォマティクス技術を用いて、今回得られたデータの分析を行いました(図5)。研究グループでは、3年半ほど前の2005年1月に転写活性化因子、転写不活性化因子、標的プロモーターの転写出力それぞれの発現のピーク時刻(図5a)と振幅(図5b)の関係を説明する法則を予測しており、今回の実測値を用いた解析により、2005年の予測をほぼ証明することができました。しかし、転写出力の振幅のシミュレーション結果(図5b)には、予測から少しだけ外れる実測値がありました。その理由を考察するために、人工転写活性化因子と人工転写不活性化因子の発現量の差と転写出力の振幅を比較してみました。その結果、人工転写活性化因子と不活性化因子の発現量の差が大きくなるときに、転写出力の振幅が予測から外れることがわかりました(図5c)。この結果は、転写活性化因子と転写不活性化因子のバランスを変えることで、転写出力の振幅が変化する可能性を示唆しました。

## (3) 転写活性化因子と転写出力の振幅の関係を予測

インフォマティクス技術の優れている点は、実験結果から対象の生命システムを説明する理論を導くことだけでなく、導き出した理論から未知の現象を予測できる点にもあります。研究グループは、上記の結果を受け、転写活性化因子か転写不活性化因子のどちらか一方の量を変えた時の、転写出力の振幅に現れる変化についてバーチャルシミュレーションを行いました。その結果、転写活性化因子を増やすと転写出力の振幅は減少し、転写不活性化因子を増やすと振幅は増加する現象を予測できました(図6左)。この予測を、実際に培養細胞が持つ自然の時計(リアル)に当てはめて確認したところ、昼の制御DNA配列(D-box)に働きかける転写活性化因子DBPを過剰発現させた場合、転写出力の振幅は減少し、転写不活性化因子E4BP4を過剰発現させた場合では、転写出力の振幅は増加しました(図6右)。これらの実験結果により、バーチャルシミュレーションの予測をリアルな細胞内で証明することができました。

また、前述のバーチャルシミュレーションにより、体内時計システムの転写制御ネットワーク内に潜む多くの可変要因が、どの程度、転写出力のピーク時刻や振幅へ影響を与えるのか、その大きさを評価することもできました。これらは、体内時計にかかわるさまざまな遺伝子の発現(時刻、振幅)を説明し、体内時計システムの転写制御ネットワークの設計原理の理解へ導きます。さらに、これらのシミュレーションにより、予測したタイミングで機能する新たな人工

のプロモーターを論理的に再構成する設計原理をも明らかにしました。  
以上のことから、これまでに同定してきた転写制御ネットワーク構造と、生体内で観察した転写ダイナミクスを現す転写回路（リアル）を、人工転写制御ネットワークに再構成する研究手法（物理的シミュレーション）を構築することができ、体内時計の転写制御ネットワークの設計原理について詳細な解析（バーチャルシミュレーション）を行うことができました。このような手法は、哺乳類概日時計のような動的で複雑なさまざまな生命システムの研究において、有用な戦略となり得ます。今回の研究により、体内時計システムのより完全な理解への一歩を進めることができました。

#### 4.今後の期待

体内時計システムを完全に理解するには、引き続きメカニズムの研究を重ねる必要がありますが、今回の研究成果は、哺乳類の体内時計システムを設計原理から解析、証明したものであり、複雑な哺乳類の体内時計システムの理解に一步近づいたといえます。このように体内時計システムの理解が進んだことで、リズム障害をはじめとする体内時計の異常によって引き起こされる疾患の、より効果的な診断や治療法の開発へつながることが期待されます。

また、今回開発した「再構成」というアプローチが、体内時計システムのような動的で複雑なネットワークや生命現象の解析に有用な手法であることを明らかにしました。今後、さまざまな生命システムの解析に役立つことが期待されます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

発生・再生科学総合研究センター

システムバイオロジー研究チーム

チームリーダー 上田 泰己 (うへだ ひろき)

Tel : 078-306-3190 / Fax : 078-306-3194

Mail : uedah-tky@umin.ac.jp

神戸研究推進部企画課

Tel : 078-306-3008 / Fax : 078-306-3039

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

#### <補足説明>

##### ※1 物理的シミュレーション

模型などを用いた検証のこと。実物を使ったリアルな実験やコンピュータ上でのバ

ーチャルシミュレーションとの区別を図る。例えば、投げられた野球ボール周辺の空気の流れを知りたいときに、実際にボールを投げて検討するのは「リアル」、コンピュータ内で予測するのは「バーチャルシミュレーション」、これらに対し、ボールまたはボールの模型に風を吹きつけ、その動きを観察（風洞実験）するのは「物理的シミュレーション」である。模型は実物を精巧に模倣しつつも、より手軽に改変を加え、さまざまな実験や解析を試みることができる。ボール自体だけでなく、吹き付ける風に変化をつけることもできる。また、得たい情報を観察しやすく改変することもできる点では、実物を用いた実験より有効な場面も多い。

これらを体内時計と本研究に当てはめて言い換えてみる。生体内に存在する自然の生命現象としての体内時計を研究対象とするのがリアル。コンピュータ内で数式などを用いて生命現象を予測・説明しようとするのは「バーチャルシミュレーション」。これらに対し、本実験で開発した人工的な部品を組み合わせて、複雑な生命現象をシンプルに「再構成」し検証する研究手法は「物理的シミュレーション」である。（図3にイメージ図。）

## ※2 プロモーター

その遺伝子からの遺伝子産物を「いつ」・「どこで（どの細胞で）」・「どのくらい」作るのかに關与する DNA 領域のこと。特に、遺伝子産物が作られ始める DNA 上の位置（転写開始点）の付近に存在する DNA 領域をさす。

## ※3 振幅

ここでは、発現量が概日周期で振動する遺伝子について、発現量の最大値と最小値の相対的な差のこと。各遺伝子の発現量の平均が等しくなるように計算上の処理をし、数値を直接比較できるようにしている。



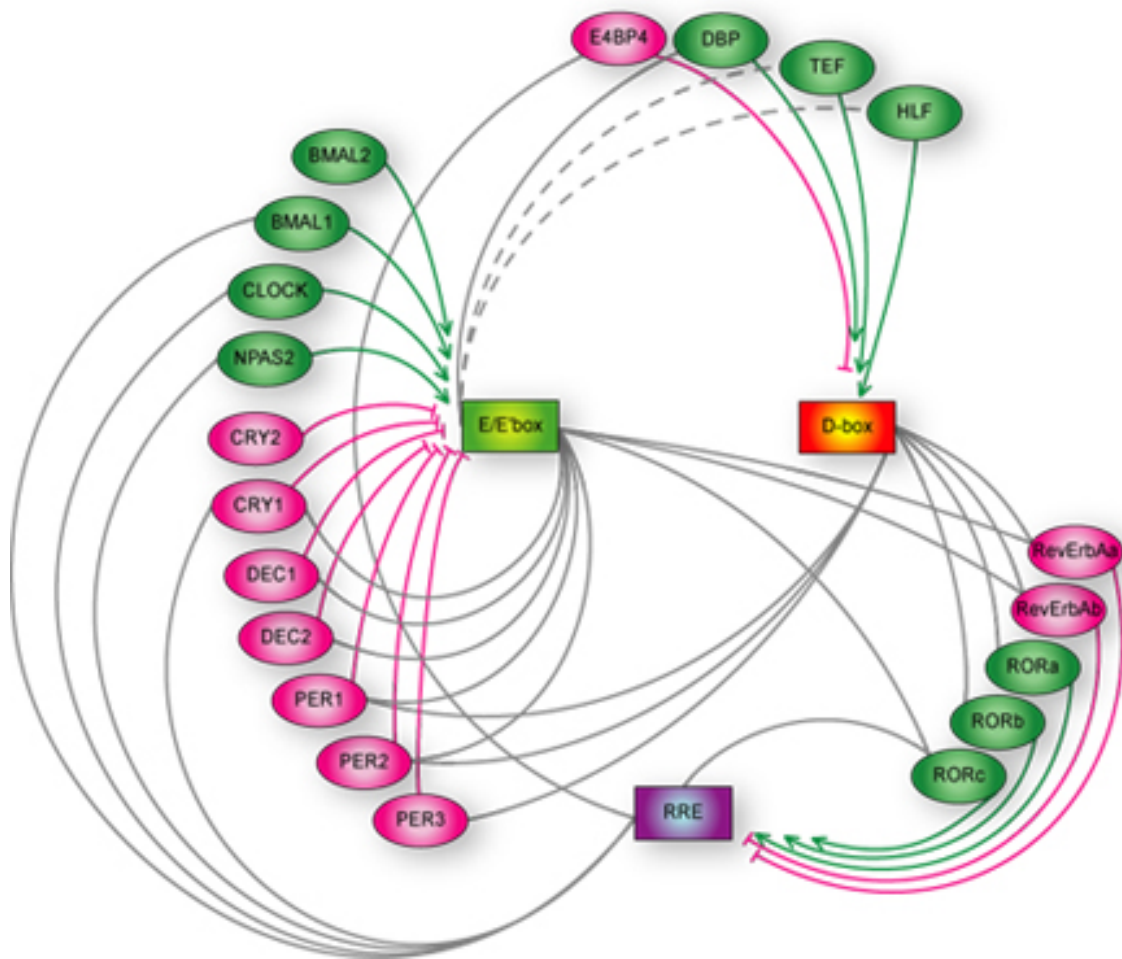


図1 哺乳類体内時計の転写制御ネットワークの設計図

時計遺伝子と制御 DNA 配列の関係。3 つの制御 DNA 配列 {E/E'box (朝配列)、D-box (昼配列)、RRE (夜配列)} と約 20 個の時計遺伝子 (転写制御因子を含む) が複雑に絡み合い、互いに制御し合っている。楕円形は時計遺伝子、四角形はゲノム DNA 上の制御 DNA 配列を示す。楕円形の緑は転写活性化因子として機能し、赤は転写不活性化因子として機能することを意味する。また、緑の曲線は、転写活性化因子とそれが活性化する制御 DNA 配列 (四角形) をつなぎ、赤の曲線は転写不活性化因子とそれが不活性化する制御 DNA 配列をつないでいる。灰色は制御 DNA 配列を持っている時計遺伝子をつないでいる。この設計図は、例えば転写因子 E4BP4 の発現が RRE 配列の制御により規定されており、また、E4BP4 自体は D-box (昼配列) の機能を不活性化していることを示す。しかし、どのような仕組みで D-box が昼の発現を達成しているのかなどは未解明であった。

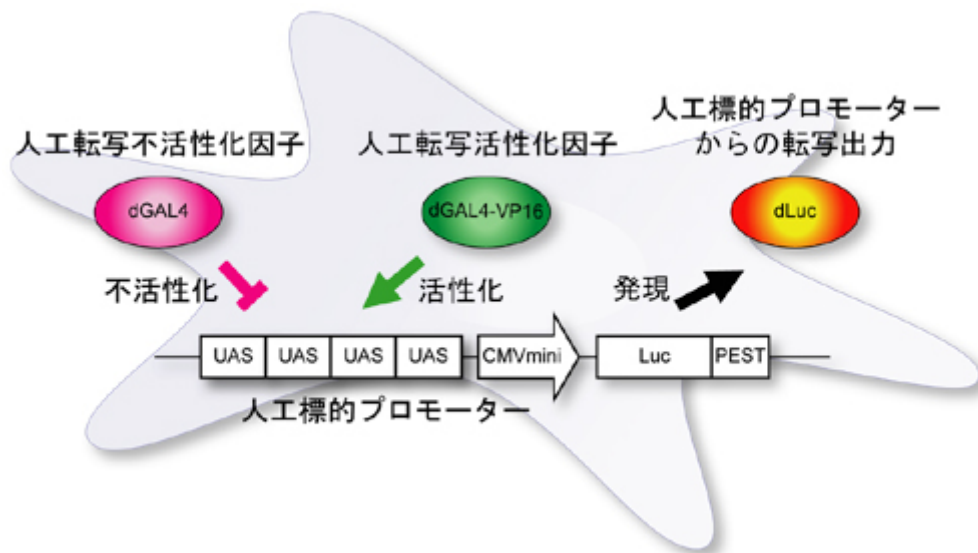


図2 人工転写制御ネットワーク

体内時計を模して人工的に設計した転写制御ネットワーク。哺乳類の体内時計システムの転写制御ネットワークの基本セット（転写活性化因子・転写不活性化因子・標的遺伝子のプロモーター）に似せた系と、哺乳類にない遺伝子を組み合わせ人工的に構築した。人工転写活性化因子には、酵母の Gal4 遺伝子の DNA 結合領域とウィルスの VP16 遺伝子の転写活性化領域を繋いだ。人工転写不活性化因子は酵母の Gal4 遺伝子の DNA 結合領域を用い、人工標的プロモーター上で人工転写活性化因子と競合的に働かせることで機能を模倣した。これらの人工転写制御因子は、体内時計の基本時刻（朝・昼・夜）で発現する仕組みにした。人工標的プロモーターに人工転写活性化因子が働きかけ活性化すると、下流の遺伝子が発現し、dLuc タンパク質が作られる。この dLuc タンパク質の活性をモニタリングすることで、人工転写制御因子が働く時刻と人工標的プロモーターが活性化する（転写出力の）時刻の関係を知らることができる。

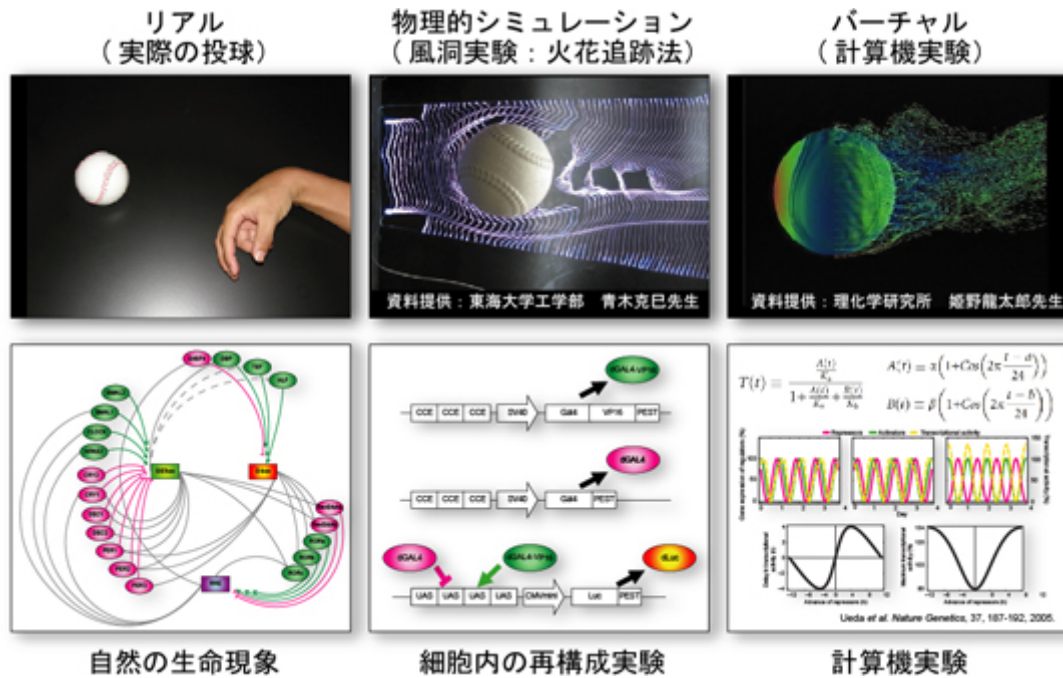


図3 「リアル」と「物理的シミュレーション」と「バーチャル」

物理的シミュレーション（中央）とは、模型などを用いた検証のこと。実物を使ったリアル（左段）な実験やコンピュータ上でのバーチャル（右段）シミュレーションとの区別を図る。例えば、投げられた野球ボール周辺の空気の流れを知りたいときに、実際にボールを投げて検討するのは「リアル」（上段左）、コンピュータ内で予測するのは「バーチャルシミュレーション」（上段右）、これらに対し、ボールまたはボールの模型に風を吹きつけ、その動きを観察（風洞実験）するのは「物理的シミュレーション」（上段中央）である。模型は実物を精巧に模倣しつつも、より手軽に改変を加え、さまざまな実験や解析を試みることができる。ボール自体だけでなく、吹き付ける風に変化をつけることもできる。また、得たい情報を観察しやすく改変することもできる点では、実物を用いた実験より有効な場面も多い。

これらを体内時計と本研究に当てはめて言い換えてみる。生体内に存在する自然の生命現象としての体内時計を研究対象とするのがリアル（下段左）。コンピュータ内で数式などを用いて生命現象を予測・説明しようとするのは「バーチャルシミュレーション」（下段右）。これらに対し、本実験で開発した人工的な部品を組み合わせ、複雑な生命現象をシンプルに「再構成」し検証する研究手法は「物理的シミュレーション」（下段中央）である。この「物理的シミュレーション」により生命システムの理解を試みる新たな研究戦略は、「リアル」な自然の生命現象と「バーチャル」な計算機実験との架け橋となりえる。

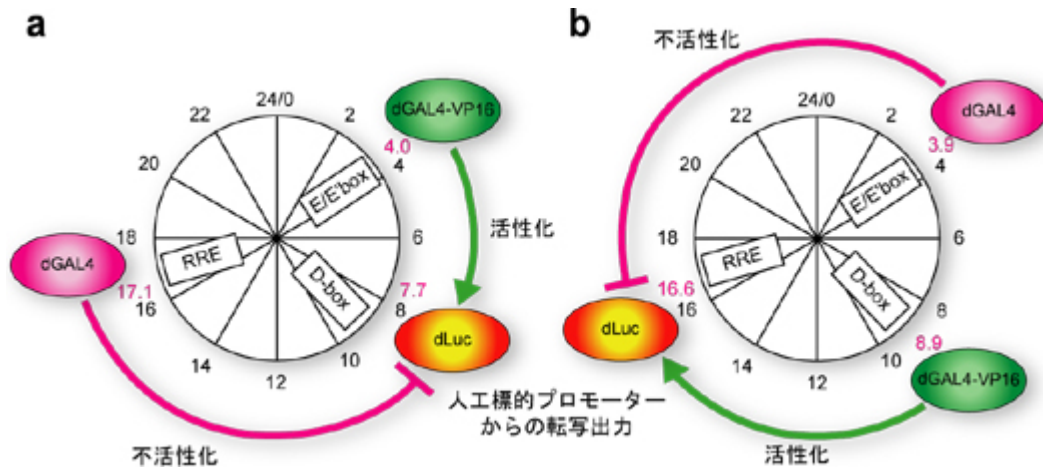


図4 人工標的プロモーターからの転写出力

人工転写制御ネットワークで観察した、人工転写制御因子と人工標的プロモーターの転写出力の時間的關係。24時間表示の時計の中に、体内時計システムの基本時刻(朝: E/E'box、昼: D-box、夜: RRE)を、それぞれの時刻に配置した。時計の外側にある楕円形はそれぞれ、赤は人工転写不活性化因子、緑は人工転写活性化因子、黄は人工標的プロモーターからの転写出力を示す。それぞれ、実験で観察された発現のピーク時刻に配置した。

- 人工転写活性化因子を朝、人工転写不活性化因子を夜に発現させたところ、人工標的プロモーターからの転写出力は昼に現れた。
- 人工転写活性化因子を昼、人工転写不活性化因子を朝に発現させたところ、人工標的プロモーターからの転写出力は夜に現れた。これらの人工標的プロモーターからの転写出力の時刻は、体内時計システムの基本時刻とほぼ一致した。

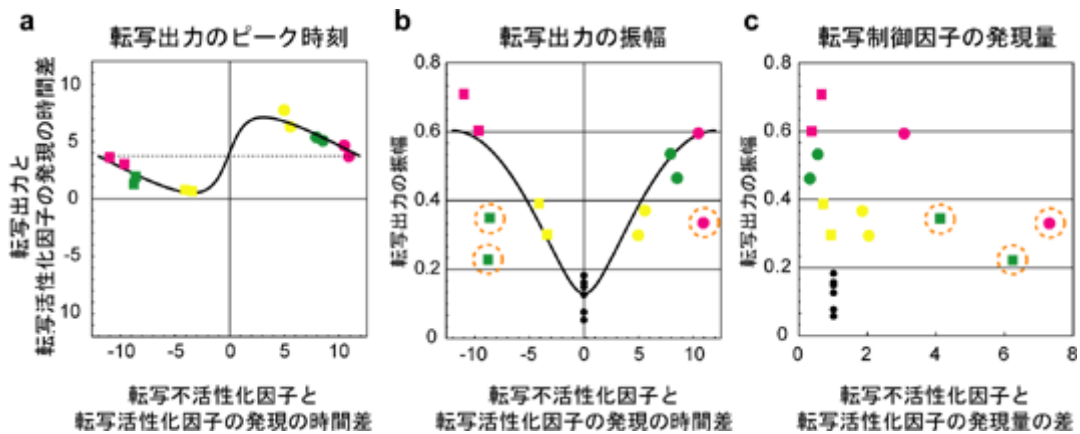


図5 転写出力のピーク時刻と振幅

- 人工転写制御ネットワークから観察された標的プロモーターからの「転写出力のピーク時刻」と、入力としての2つの転写制御因子(転写活性化因子と転写不活性化因子)との關係。「転写出力のピーク時刻」は、転写出力の発現のピーク時刻と転写活性化因子の発現のピーク時刻との時間差で表現されている(図の縦軸)。



- (b) 人工転写制御ネットワークから観察された標的プロモーターからの「転写出力の振幅」と、入力としての2つの転写制御因子（転写活性化因子と転写不活性化因子）との関係。(a) (b)ともに、転写活性化因子と転写不活性化因子の発現のピーク時刻の時間差が図の横軸として表現されている。赤・緑・黄・黒の点は今回の研究から得た実測値。黒い曲線は、実測値から計算した全時間帯の予測値。(a)、(b)の結果は、2005年に研究グループが予測したバーチャルシミュレーション結果 (Ueda *et al.*, *Nature Genetics*, 2005) と一致した。
- (c) オレンジの丸で囲った点は予測値からの"外れ値"で、転写活性化因子と転写不活性化因子の発現量の差が大きい場合、予測から外れた振幅を示すことがわかった。

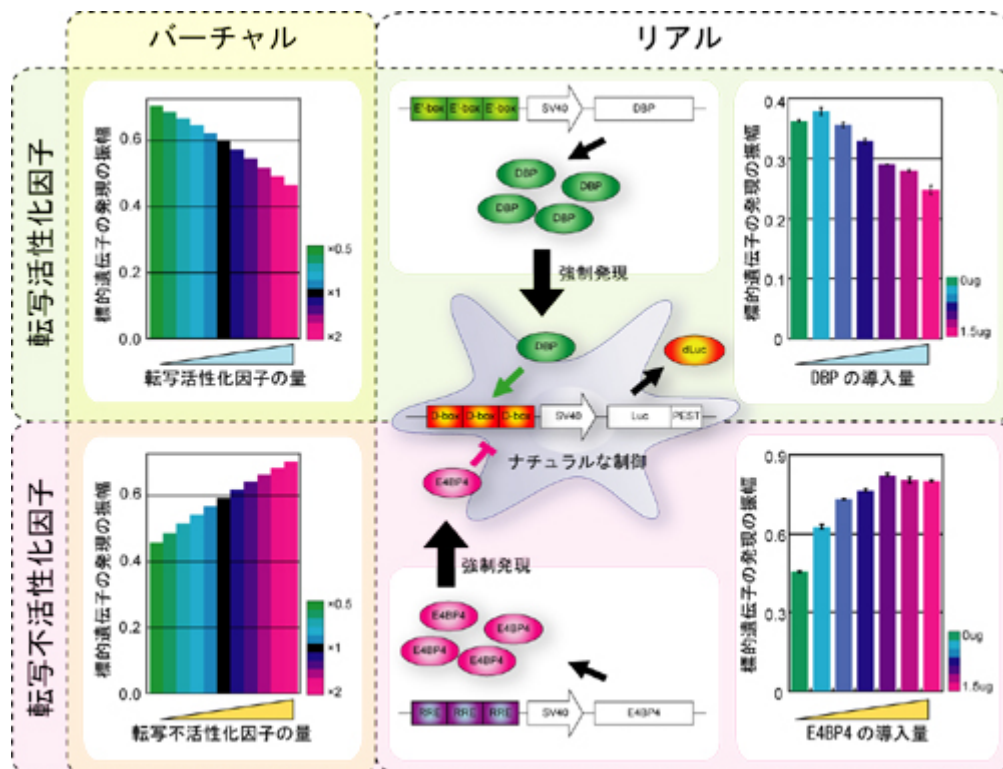


図6 転写制御因子量と振幅の関係

(左) 転写活性化因子 (上) か転写不活性化因子 (下) のどちらかの量を変えた時の、転写出力の振幅に現れる変化をバーチャルシミュレーションで予測した。

(右) 実際に培養細胞が持つ自然の時計 (リアル) で確認した。昼の制御 DNA 配列 (D-box) に働きかける転写因子を、細胞が持つ元の量以上に過剰発現させた。転写活性化因子 DBP を過剰発現させた場合、転写出力の振幅は減少、転写不活性化因子 E4BP4 を過剰発現させた場合、転写出力の振幅は増加した。振幅の量的な違いはあるが、質的にはバーチャルシミュレーションの予測を細胞内 (リアル) で証明することができた。