

進化実験系における配列空間適応歩行の理論的解析
Rational Design of Adaptive Walks in the Sequence Space
for the Experimental Molecular Evolution

相田 拓洋^{1, 2}、伏見 譲^{1*}
Takuyo Aita^{1,2}, Yuzuru Husimi¹

¹ 埼玉大学工学部機能材料工学科
Department of Functional Materials Science, Saitama University

² ノバルティスファーマ (株) 筑波研究所
Tsukuba Research Institute, Novartis Pharma K.K.

Abstract

This article describes the major theoretical results by our team in the national research project on evolutionary protein engineering, a 7-years (FY1995-2001) project in the R&D Project of the Industrial Science and Technology Frontier Program supported by NEDO (New Energy and Industrial Technology Development Organization, Ministry of Economy, Trade and Industry, Japan). We analyzed the local and the global fitness landscapes on the protein sequence space and proposed several fast evolution strategies on the landscape, one of which was successfully realized in the laboratory.

Key Words: Evolutionary protein engineering, Directed evolution, Fitness landscape, Evolvability

1. はじめに

本研究は、平成7年度－13年度の7年間にわたり、NEDO/通産省・経産省の産業科学技術研究開発制度による「加速型生物機能構築技術」プロジェクトで行われた。このプロジェクトは、ダーウィン進化の機構に基づいて、人工的な変異と淘汰の繰り返しシステム（進化実験系）を構築し、優れた生物機能を効率的に創出するという新しいバイオテクノロジー、進化分子工学[1,23-28,30-34]、の基幹技術確立することを目的としている。*埼玉大学が委託したテーマは、進化分子工学の理論的基盤を整

備し、高機能バイオ分子の合理的適応設計[4]、すなわち、配列空間の適応歩行を合理化することであった。

進化分子工学では、実験者が進化する分子系の環境を設定し、かつ、構成要素間の相互作用を可能な限りはぎ取るという理想化単純化を行う。この結果、生体高分子1分子の進化を、他の高分子との相互依存関係を無視して取り扱うことができる。この独立粒子モデルが有効な場合は、生体高分子の進化を、配列空間における適応度の地形(fitness landscape)と、その上の突然変異体集団の適応歩行問題に落とし込むことができる。ここで、生体高分子の「適応度」(fitness)とは、集団遺伝学で導入された適応度概念を拡張したもので、その生体高分子の物

* 〒338-8570 さいたま市下大久保255
電話：048-858-3531 FAX：048-858-3531
Email：husimi@fms.saitama-u.ac.jp*

性の評価値である。例えば、ある特定のリガンドの結合能を評価したい場合は、結合反応のギブズ自由エネルギー ΔG 、あるいは、結合反応速度定数の ΔG^\ddagger を適応度として採用することになる。

ところが、単純化したと言っても未だ十分複雑である。すなわち、タンパク質 1 分子の特異的立体構造成問題（フォールディング問題）が既に、正面突破しようとする、Levinthal パラドックスに象徴されるように十分複雑であるのとちょうど同じように、タンパク質分子 1 機能の適応度地形の問題も、正面突破しようとする、Kauffman[2]のNKモデルのような複雑性を生むことになる。

本研究においては、この後者の複雑性を回避するために第二の単純化理想化を行った。適応度地形の理想化である。理想地形とは、配列空間の任意の点から、点突然変異のみを重ねて登るのみで適応度最大点に至る経路が存在するような地形である。この場合は、配列空間の点の総数に相当する、長さの指数関数に比例するランダム試行回数（全数調査と同じ）ではなく、長さのそのものに比例するランダム試行回数で最適点に達することができる。尾根筋の下に広がる広大な大地は試行する必要が全くないからである。これこそダーウィン進化の漸進的高速進化を理想的に体现する場合である。配列空間を 1 次元軸で模式的に表すと、理想地形は富士山の絵のようになる。そこで、この理想地形を富士山型地形とも呼ぶ。

これは既定の物性量に対する大胆な近似なので、実験系の設定に係わる第 1 の単純化理想化の場合よりも危険を伴うが、第 1 の単純化が行われている場合は実験的検証が可能であるので作業仮説として導入してよい。理想地形は、理想気体と同じように、理論を展開しやすい。その理論に基づいて蛋白質の改良や機能性ペプチドの進化分子工学実験のデータを解析した結果は、この作業仮説を支持するものとなった。また、蛋白質工学において点突然変異の効果の統計的相加性を示すデータが数多く報告されていることもこの仮説に有利である。従って、

理想地形は、既存蛋白質近傍の局所的事実地形や、ペプチドの実在地形の第一近似モデルにできると思われる。核酸や蛋白質がこの性質を持つことは、核酸や蛋白質の進化能（Evolvability）の一つの現れである。

一方、大域的な適応度地形の描像を得ることは、全く新しい蛋白質機能を創出するのに必須である。大域的な地形を、ユークリッド空間での多峰性地形になぞらえて描く人が多いが、これは誤解を招きやすい。配列空間の特殊性から、峰と峰の間が重畳し、谷に降りなくても隣の峰に飛べる可能性が大いにある。これは中立ネットワークと呼ばれ、Schusterら[3]が RNA の 2 次構造フォールディング地形に対して新たに発見した生体高分子の進化能であるといえる。本研究では、蛋白質にも中立ネットワークがあるかどうかの理論的研究を行い、肯定的な結論を得た。

実在地形が理想地形に近いと、それに応じた効率的な適応歩行戦略が考えられる。われわれは、バイアスのかかった Mutational Scrambling 法を提案した。以下にここで述べた概要の各項目を説明する。

2. 理想地形のモデル[6]

生体高分子の残基の置換に関し、その様々な物性量に対応するギブズ自由エネルギー変化 $\Delta \Delta G$ に相加性が成立すると仮定してみよう。すると、そのギブズ自由エネルギー ΔG を適応度とする地形は富士山型となることは容易にわかる。蛋白質のような多値（20 値）配列空間ではこの地形は必ずしも円錐状の単純なものではない。富士山型地形の名に反して、尾根筋以外の方向には凸凹しているのである。我々は、アミノ酸配列の任意の部位に関して、残基置換に対する寛容性を表現する「寛容度関数」を導入し、理想地形の定量的理論を構築した。ある野生型配列を中心とした、ハミング距離 d の突然変異体集団の適応度分布を定式化した。この野生型配列から見た景観が、適応度の山を登るにつれどう変化してゆくかを明らかにした。

3. 理想地形から実在地形へ

我々は上記の理想地形からの近似を進めることによって実在地形へ接近した。

3. 1 凸凹地形の重畳した富士山型地形モデル

蛋白質分子の適応度（最適配列の適応度を原点とする）は、各突然変異の効果の線形寄与と非線形寄与から成る。線形項は部位適応度の和として与えられ、配列空間中に平均勾配 ε の富士山を形成する。一方、本項のモデルでは、非線形項は正規分布 $N(0, \sigma)$ に従ってランダムに与えられるとし、地形表面に標準偏差 σ の凸凹を与える。平均勾配と凸凹度の比を $\theta = \varepsilon / \sigma$ として、理想地形への近さの指標とする。実在地形を、この理想地形上に無相関な凸凹が重畳した地形として現象論的にモデル化し、様々な実在地形が理想地形にどの程度近いかをこの θ 値により評価した。①Houghten らのリガンド結合性ペプチドや、宇高（京大）らによる MHC I 分子 3 種に結合するペプチドのポジショナルスクランニング実験データを詳しく評価した。その結果、これらのペプチドの全配列空間での、結合能 ΔG を適応度とする地形が、わずかな凸凹が重畳した理想型（富士山型）として良いことがわかった [6,17]。②巖倉（工技院生命研）らの得た DHFR の酵素活性に関する局所的適応度地形データの解析を行った結果、その地形がアミノ酸残基の相加性に基づく富士山型地形に非常に近いことがわかった。すなわち、 θ 値は 2.8 で、この値の Z-score は 7.0 であった [17]。③城所ら（相模中研）によるサーモリシンのアスパルテーム合成活性のデータは、 $\theta = 8.5$ 、Z-score=25 という限りなく富士山型に近いものであった。[12] ④ノバルティスファーマ（当初はチバガイギー）・グループが実験した酵素プロリルエンドペプチダーゼの耐熱性を向上させる実験の結果を解析した。有利点突然変異体 8 種から作られた、多重点突然変異体の耐熱性の実験データから、ハミング距離 8 の局所的適応度地形の描像を得た。上記の θ 値が 1.7 程度の、凸凹の少し重畳した富士

山型としてよいことがわかった [12]。

3. 2 フラストレーションする多段反応モデル

多段反応における部分適応度間のフラストレーションも凸凹を生む。例えば、酵素の触媒能は、遷移状態結合・生産物解離という少なくとも 2 段階の反応を統合したものである。各段階の特性（部分適応度）が富士山型地形であっても、それぞれのピーク（最適配列）の位置が異なれば、触媒能全体（全適応度）としての地形は、フラストレーションを起こし凸凹になるかも知れない。我々は、次のようなモデルでこの地形間のフラストレーションの問題を調べた [8]。20 値 20 次元配列空間上の、L 段カスケード反応の全反応速度の地形が、部分適応度の地形間の相関を表す量の相関係数 r 、各段の寛容度関数の形状を表すパラメータ n （大なるほどアミノ酸置換に対する寛容度なし）、に依存して、富士山型からどの程度ずれるかを調べた。L が大きいほど、 r が -1 に近づくほど、 n が大きいほど、局所最適点が多量出現し、凸凹さを増す。しかし、 r が -1 に極めて近くない限り、局所最適点はハミング距離 L の領域ではもはや最適点ではないことがわかった。すなわち、ハミング距離 L の歩幅で歩行すれば、富士山型の場合と同じ適応歩行ができる。L が小さい場合は確実な適応歩行をするための突然変異体プールサイズは実験可能量にとどまる。

3. 3 非線形項を陽に取り入れたモデル

特定の 2 部位間に大きなエピスタシスがある場合、例えば、各部位の有利突然変異を両方とも導入した場合、相加的に有利になるどころか、かえって有害になるような場合がある。このようなことが複数の部位対で起こる場合も扱えるように富士山型地形理論を拡張した。蛋白質の適応度に、部位適応度の和で寄与する部位と、ペア適応度で寄与する部位対に分けて処理するのである。下記 6 節に示すように、プロリルエンドペプチダーゼに対する、バイアスをかけた Mutation scrambling 法（ハミング距離 14）を用いた熱安定性進化実験の結果は、ほぼ理論の予測通りとなった。しかし、混合比が大きくなるにつれ、突然変異体適

応度スペクトルは、相加性に基づく富士山型モデルの理論値からずれてくる。このずれは、特定の2部位間のたった一つの大きなエピスタシスを仮定することによって説明できた。その2つの部位は、立体構造上1 nm以内に接近していた。しかも、1nm以内に接近している部位対が他にも複数あったにもかかわらず、データを説明するのに、第2のエピスタシスを導入する必要はなかった。強く相互作用する突然変異部位は確かに存在するが、それは例外的であるということである（この実験の場合は14部位に1対のエピスタシス）[18]。

4. 理想地形上の最適な適応歩行

富士山型地形の目隠しをした山登り(適応歩行)は、部位特異的な突然変異導入ができる場合は、親配列に対して特定の部位に対してプールサイズ $N = \lambda - 1$ の1点突然変異集団を作り、その部位をスクランピングしていけば、歩数 $T = \nu$ で確実に頂上に達することができる。ここで、 λ はアルファベットの文字数であり、 ν は文字列の長さである。 $N = 1$ で、 $T = \lambda(\nu - 1)$ としても同じである。コストが NT に比例するとき、両歩行法のコストは同じだが、後者の歩行法は時間がかかる。最も速い歩行法は、プールサイズが配列空間の点の総数 $\lambda^\nu = N_0 = N$ の突然変異集団を作り、たった $T = 1$ 回の淘汰で、頂上に達する歩行法である。しかしこの歩行法はコストが最も大きい。 ν が少し大きくなると N_0 が巨大となり実際上不可能となる。

部位特異的な突然変異導入が困難なときは、尾根筋を通る歩幅1ハミング距離の着実な歩行(ハミング距離1のサイズ $N = \nu(\lambda - 1)$ の突然変異体プールからの最適者を淘汰)を行えば、配列の長さ ν に相当する歩数 T で、確実に頂上に到達する。 $N (\ll N_0)$ が与えられたとき、最小の歩数で到達する歩幅(突然変異率)のスケジュールは何か？ コストは歩数(試行回数) T と N の関数であろうが、コストパフォーマンスを最適化する歩行法は何か？ クローニング・スクリーニング型進化リアクターに対する

この問題を、前節の理論を発展させ、Rechenbergの $(1 + N)$ -ES(進化戦略)モデルで研究した[9]。

富士山の麓にいるときは、周囲の景観は等方的であり、突然変異体は確率1/2で有利突然変異体である。従って、 N が小さくても、歩幅の大きな歩行をした方が、一気に高所に登れる。頂上に近づくにつれ、 N が小さいとき、大きな歩幅の歩行はむしろ山を下る確率が高くなるので避けるべきである。クローニング・スクリーニングではコストがスクリーニングされる総突然変異体数に比例すると考えられるので、コストパフォーマンスは、 N が小さく、従って歩幅の小さい歩行法の方ほど改善される。

5. モデル実在地形上の適応歩行

理想地形に対して前節の結論は、半ばトリビアルであるが、そこで構築した理論を、地形が理想から少し離れた実在地形の歩行法の理論へ発展させた[11]。今回は、 $\theta = 1 \sim 2$ の場合を扱った。地形を“ x (富士山頂配列からのハミング距離)と y (富士山頂配列からの線形適応度差)と z (非線形適応度)を変数とする xyz 空間”に写像し、適応歩行をこの xyz 空間上の軌跡として表現した。変異過程と淘汰過程から成る進化サイクルは、 xyz 空間上に適応歩行者の移動方向を確率的に記述するベクトル場を形成する。

結論として、 $\theta = 1 \sim 2$ の場合、ショットガン型探索戦略と $(1, N)$ -ESを併用すると、局所的最適点への捕捉を回避しながら山の頂上付近($y = -0.1 \sim -0.2$ に存在する捕捉線)に到達することが可能である。ポジショナルスクランピングで山頂付近に到達可能なのは $\theta > 2$ の場合である。 $\theta = 1$ では到達点が $y = -0.43$ であり、有効性はほとんどない。

6. バイアスをかけた Mutation scrambling 法による高速進化

ノバルティスファーマの開発した有利突然変異の蓄積による高速進化法: Mutation scrambling 法の従来法は、野生型断片と有利変異体断片の混合比

を1:1にして、全ての突然変異体を評価している。しかしこの方法では、アミノ酸の置換数が増えるにつれ全ての突然変異体を評価する事が困難となる。適応度地形が富士山型に近い場合は、野生型より有利突然変異体に重み付けをした方が効率がよいと考えられる。そこで、混合比にバイアスを掛けて(野生型断片と有利変異体断片の混合比を3:7から1:9の範囲とする)母集団の適応度分布を適応度の高い方向にシフトさせ、少ないスクリーニング数で最適配列を選択できることを理論的に示した[14,15]。ノバルティスファーマによってプロリルエンドペプチダーゼの熱安定性に対する実験結果は、ほぼ理論の予測通りとなった。しかし、混合比が大きくなるにつれ、突然変異体適応度スペクトルは、相加性に基づく富士山型モデルの理論値からずれてくる。このずれは、たった一つの特定の2部位間の大きなエピスタシスを仮定することによって説明できた(上述)[18]。この方法で、混合比を1:9にすることにより、従来法より少ないスクリーニング数で、野生型の2000倍の熱安定性(57.5°Cにおける酵素活性半減期)を持つ多重(13重)変異体を得ることができた。

この方法は、StemmerのDNA shuffling法[5]に比較し、簡便さでは劣るが、一回の相同組み換えで高適応度変異体を得る確率をはるかに高い。

7. 配列空間上の大域的適応度地形の解析: 蛋白質の中立ネットワークの調査

タンパク質配列空間における中立ネットワークの存在と、ネットワーク間の架橋点に近いものの存在を確認した[20]。PDBから、長さ108残基の蛋白質で、 α 型、 β 型、 α/β 型、 $\alpha+\beta$ 型の代表的フォールドを一つづつ選び、これらのフォールドに対して、Otaの経験的ポテンシャルを採用し、一種の逆フォールディング問題を計算した。中立性の判定条件は、立体構造安定化エネルギーのZ-scoreのシキイ値を設定することで行った。まず、各フォールドを与えるアミノ配列が、この評価法では、確

かに配列空間全体をパーコレートしていることを確認した。すなわち、中立ネットワークが配列空間全体に張り巡らされている。次に、2種のフォールドに対応する2つのネットワーク間の架橋性を調べた。各ネットワーク上の点2点を出発点として中立経路を辿りながら互いにどこまで接近できるかというClosest approach法を採用した。その結果、われわれが採用した条件下では、ハミング距離5まで接近できることがわかった。4種のフォールドに対応する4つのネットワークの架橋性についても、これと似た方法で調べた。4者はハミング距離20程度まで接近できる。また、任意の点から、特定の中立ネットワークに登るまでのハミング距離を調べたところ、平均約25であった。これらの結果は、配列空間の半径20-30の球内に、ほとんどの立体構造に対応する配列が存在していることを示唆する。すなわち、SchusterがRNAで発見した「形状空間の被覆」が蛋白質でも成立するようである。

なお、この研究の際、Z-scoreを計算するとき必要となる参照配列のエネルギー分布の計算を、モンテカルロ法ではなく、アミノ酸組成を引数とする関数として与える公式を見いだした[21]。

8. 適応度地形の観点からの遺伝コード表の解析

遺伝コード表は、各コドンをもとに4値3次元配列空間上の点とし、各点に対応するアミノ酸の物性の地形を表現しているとみなせる。この地形を上記の適応度地形の理論を用いて解析した[10,13,29]。各点がコードするアミノ酸の、各種疎水性値、分子容、比熱、 α ヘリックス傾向指数、 β シート傾向指数、など、11種の物理化学的性質を採りあげ、標準遺伝コード(SGC)と、そのアミノ酸-コドン対応関係をランダムにシャッフルした「変異」遺伝コード1000種に対して、これらの物性に対する地形の θ の値を求め、SGCのZ-scoreを求めたところ、SGCに対して多くの物性の地形が富士山型に近いことがわかった。特に各種疎水性値の地形が富士山型に近い。さらに、

これらアミノ酸物性値の多くは、特に各種疎水性値は、上記宇高らのペプチドにおける部位適応度との間に相関があることを確認した。従来から半定量的に知られていた遺伝コード表の *mutational robustness* を定量的に表現したことになる。しかも重要なことは、SGCに対しては、互いに無関係な地形が矛盾無く富士山型地形を成すように構成されている点である。タンパク質の適応度地形はアミノ酸配列空間上で富士山型に近いが、今回の結果は、その遺伝子の塩基配列空間上では、蛋白質の適応度地形はより富士山型に近くなることを示している。従って、標準遺伝コード表 (SGC) の地形の性質は適応歩行の安定性と効率を高めていることがわかった。このことはモデル蛋白の適応歩行シミュレーションによって確認できた。SGCの導入は、進化能 (Evolvability) の進化の例であると言える。別の言い方をすると、進化学において、現行の20種のアミノ酸を使用する限り、新遺伝コード表を導入するメリットは少ない。

9. 結論と展望

実在地形には、理想地形から接近するルートと、無相関凸凹地形から接近するルートがある。本研究は、進化してきたという実績を持つ現在の蛋白質のまわりの局所的地形は、理想地形から接近する方がよいことを明らかにした。また、天然の蛋白質は適応度の山のいわば8合目付近に位置するのであって、頂上に位置するのではない。天然の進化では、蛋白質はシステムの部品として進化してきたのであって、その単独の機能を評価関数 (適応度) として進化してきたのではないからであろう。また、この理想地形に近いことを積極的に利用した高速適応歩行法が実現した。

この *Biased Mutational Scrambling* 法は初期有利1点突然変異体ライブラリーを要求する。これを機械的に作成する方法の開発をするべきである。現在当研究室では、核酸ならびに蛋白質のハミングラ

イブラリー作製法のアイディアを得、その実現に向けて予備的検討を行っている。

蛋白質の大域的な適応度地形の研究では、中立ネットワークとネットワーク間の架橋性について肯定的な結論を得た。素朴な多峰性のイメージは、配列空間の超多次元性を考慮しておらず、大域的高速進化にとって誤解の元であることがわかる。今回の調査は、上限を押さえる意味で、互いに大きく異なる構造の間の架橋性であったが、今後、互いに似て非なる多数の構造間の架橋性を調査し、適応進化と中立進化の割合の評価、「上高地配列」の存在密度の評価を行う必要がある。

ここで、上高地配列とは、複数の異なった適応度地形に登るための出発配列、広範囲の *specialist* 蛋白への進化の出発配列となる *generalist* 蛋白をさす造語である[19]。このような *Generalist* 分子の進化機構は、タンパク質の構造多型・柔軟性を取り入れた地形のモデルを介して解明できるかも知れない。

莫大な分子多様性をもつ蛋白質集団を扱える *in vitro* ウイルス法[7,16]を用いて、現実の大域的適応度地形を実験的に探索し、上記理論と比較したり、「上高地配列」を取得する実験系を検討すべきであろう。

進化分子工学は高機能バイオ分子を創出するための中心的方法として医療・環境・産業・エネルギー・生活・情報分野に展開すると同時に、生命の起源研究を革新するだろう。それは非生物系へ応用できる高機能「バイオ」分子を設計する手段であり、分子コンピュータなどのバイオ技術とナノ技術と情報技術の融合分野を開拓するに違いない[33, 34]。

謝辞

本研究は、冒頭に述べたプロジェクト推進のため、NEDOの委託を受けたバイオテクノロジー開発技術研究組合からの再委託によって行われた。関係機関と、プロジェクトに参加された方々のご支援とご厚意、建設的討論に感謝する。

参考文献

- [1] Eigen, M., Gardiner, W.: Evolutionary molecular engineering based on RNA replication, *Pure & Applied Chem.* **56**, 967-978 (1984)
- [2] Kauffman, S.A.: *The Origins of Order* (Oxford Univ. Press, 1993)
- [3] Schuster, P., Fontana, W., Stadler, P.F., Hofacker, I.: From sequences to shapes and back: a case study in RNA secondary structures, *Proc. R. Soc. Lond. B* **255**, 279-284 (1994)
- [4] Voigt, C.A., Kauffman, S.A., Wang, Z.G.: Rational Evolutionary Design: The theory of *in vitro* protein evolution, *Adv. Protein Chem.* **55**, 79-160 (2000)
- [5] Stemmer, W.: DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **91**, 10747-10751 (1994)
- [6] Aita, T., Husimi, Y.: Fitness Spectrum among Random Mutants on Mt. Fuji-type Fitness Landscape, *J. Theor. Biol.* **182**, 469-485, (1996).
- [7] Nemoto, N., Miyamoto-sato, E., Husimi, Y., and Yanagawa, H.: *In vitro* virus: Bonding of mRNA bearing puromycin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome *in vitro*, *FEBS Lett.* **41**, 405-408 (1997)
- [8] Aita, T., and Husimi, Y.: Fitness Landscape for a Biopolymer Participating in a Multi-step reaction, *J. Theor. Biol.* **191**, 337-390, (1998)
- [9] Aita, T., and Husimi, Y.: Adaptive walks by the Fittest among finite random mutants on the Mt. Fuji-type Fitness Landscape, *J. Theor. Biol.* **193**, 383-405, (1998)
- [10] Husimi, Y., Aita, T. and Urata, S.: An Evolution of Evolvability: The second coding with correlated mapping, *Preliminary Proceedings DIMACS Workshop on Evolution as Computation*, pp.229-234, (1999)
- [11] Aita, T. and Husimi, Y.: Adaptive walks by the Fittest using Finite Random Mutants on a Mt. Fuji-type Fitness Landscape II: The effect of small nonadditivity, *J. Math. Biol.* **41**, 207-231 (2000)
- [12] Aita, T., Uchiyama, H., Inaoka, T., Nakajima, M., Kokubo, T. and Husimi, Y.: Analysis of Local Fitness Landscapes with a Model of the Rough Mt. Fuji-type Landscape: Application to Prolyl endopeptidase and Thermolysin, *Biopolymers* **54**, 64-79 (2000)
- [13] Aita, T., Urata, S. and Husimi, Y.: From amino acid landscape to protein landscape: Analysis of genetic codes in terms of fitness landscape, *J. Mol. Evol.* **50**, 313-323 (2000)
- [14] Aita, T., Husimi, Y.: Theory of an Evolutionary Molecular Engineering using Simultaneous Accumulation of Advantageous Mutations. *J. Theor. Biol.* **207**, 543-556 (2000)
- [15] Aita, T., Husimi, Y.: Fitness landscape of biopolymers and efficient optimization strategy in evolutionary molecular engineering. *Proc. of 6th Int. Sympo. on A-life and Robotics* **6**, 365--368 (2001)
- [16] Tabuchi I., Soramoto, S., Nemoto N. Husimi Y., An *in vitro* DNA virus for *in vitro* protein evolution, *FEBS Lett.* **508**, 309-312 (2001)
- [17] Aita T., Iwakura H., Husimi Y., A Cross-section of the Fitness Landscape of Dihydrofolate Reductase, *Protein Engineering* **14**, 623-628 (2001)
- [18] Aita T., Hamamatsu N., Nomiya Y., Uchiyama H., Husimi Y., Surveying a local fitness landscape of a protein with epistatic sites for the study of directed evolution, *Biopolymers* **64**, 95-105 (2002).
- [19] Husimi Y., Aita T., Tabuchi I., Correlated flexible molecular coding and molecular Evolvability, *J. Biol. Phys.* (2002) *in press*.
- [20] Aita T., Ota M., Husimi Y., *In silico* exploration of neutral network in protein sequence space, *submitted*.
- [21] Aita T., Husimi Y., Statistical formulae for the energy distribution over globular protein structure ensemble, *submitted*.
- [22] 伏見 譲, 相田拓洋: 進化のダイナミクス, in 金久 実編, シリーズ・ニューバイオフィジックス第11巻「ヒューマングノム計画」, (共立出版, (1997)).
- [23] 伏見 譲: 遺伝情報の起源と進化の実験, *Academia*, (1998) No.173, pp24-33.
- [24] 伏見 譲, 根本直人: 進化分子工学のすすめ, *日本物理学会誌* **52**, 680-686 (1997).
- [25] 伏見 譲: 生命の起源と進化: もう一つの見方, *生物物理*, **39**(1), 40-41 (1999)
- [26] 伏見 譲: 20世紀の物理学編集委員会編「20世紀の物理学・第3巻」(丸善, 1999) pp.601-627
- [27] 伏見 譲: 連載講座「蛋白質の進化分子工学」-1 進化分子工学とは. *化学と生物*, **37**, 678-684 (1999)
- [28] 相田拓洋、中島元夫: 連載講座「蛋白質の進化分子工学」-4 蛋白質の適応度地形と高効率の適応歩行法. *化学と生物*, **37**, 815-820 (1999)
- [29] 伏見 譲, 相田 拓洋: 遺伝コードの物理---実験進化の視点から. *数理科学*, **38**, 37-43 (2000)
- [30] 伏見 譲: ゲノム情報科学と進化工学. *生物物理* **40**, 17-18 (2000)
- [31] 伏見 譲, 山本裕二、伊藤洋一郎: 「*in vitro* 自己増殖系」, in 長田義仁編「バイオミメティックス・ハンドブック」(NTS, 2000) pp.377-385.
- [32] 四方哲也、伏見譲: 構成的生物学, in 金子 邦彦編 シリーズ・ニューバイオフィジックスII第7巻「複雑系のバイオフィジックス」(共立出版, 2001) pp.127-154.
- [33] 伏見 譲: これからの生命科学, in 伏見編、別冊数理科学「生命情報科学の拡がり」pp.6-11 (2001)
- [34] 伏見 譲編 シリーズ・ニューバイオフィジックスII第8巻「生命の起源と進化の物理学」(共立出版, 2002) .