

DESIGN OF AN OPEN SYSTEM IN THE THERMODYNAMIC SENSE FOR THE CHEMICAL EVOLUTION OF BIOPOLYMERS. 1. INFLUENCE OF THE STEPWISE ADDITION OF ACTIVATED NUCLEOTIDE MONOMER TO THE TEMPLATE-DIRECTED FORMATION OF OLIGOGUANYLATE

Kunio Kawamura* and Akira Nakamura

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University, Gakuen-cho 1-1, Sakai, Osaka 599-8531, Japan.

Fax: +81-72-254-9910; Email: kawamura@chem.osakafu-u.ac.jp

(Received: November 17, 2006 Accepted: December 25, 2006)

(Abstract)

To construct a flow reactor system, which enables to simulate the chemical evolution of biopolymers in an open system in the thermodynamic sense, the influence of stepwise addition of the 2-methylimidazolide of guanosine 5'-monophosphate (2MeImpG) to the template-directed formation of oligoguanylate (oligoG) on polycytidylic acid (polyC) template (TD reaction) was investigated. Both the experiment and the computational simulation of the addition of 2MeImpG showed that the higher oligoGs were accumulated by the addition of 2MeImpG. In addition, the elongation of oligoG was slightly effective when the activated nucleotide monomer was added within a shorter interval period, where the total amount of the addition of the activated monomer was kept as constant. This fact indicates that the continuous supplement of 2MeImpG would facilitate the formation of oligoG rather than the stepwise addition of 2MeImpG when the total amount of guanosine unit was increased. The present study showed that the computer simulations concerning the TD reaction can be used to evaluate experimental data of the TD reaction.

(Keywords)

open system, experimental design, nucleotide, biopolymer, thermodynamics, kinetics,

熱力学的な開放系の化学進化実験系の試作とその解析：(1) オリゴグアニル酸の鋳型指示生成反応を用いるモノマーの逐次供給の影響

川村邦男*, 中村光

大阪府立大学大学院工学研究科応用化学分野

〒599-8531 大阪府堺市学園町 1-1

Fax: 072-254-9910; Email: kawamura@chem.osakafu-u.ac.jp

1. 序論

生物はエネルギーと物質を環境との間で交換することによって生命活動を維持している。つまり、生命系は熱力学的な開放系である。従って化学進化の研究では、生命に発展した化学反応系は熱力学的な開放系であるという視点を持ち込むことが必要である。このような条件を意図して行った実験的な研究は少ない。例えば、Millerの実験[1]や今井・松野らの深海底の熱水噴出口を模した実験[2]は、放電あるいは熱エネルギーを外から供給する系であると見なすことができる。しかし、これらの例のように熱や放射線を外部から加えることは比較的簡単にできるが、物質を流入させる系でしかも溶液系の化学進化の実験は少ない。Ferrisらは鉍物触媒を用いてモノマーを定期的に添加して長鎖のオリゴヌクレオチドやオリゴペプチドを生成させた[3]。また、RNAの*in vitro* selectionは原料を段階的に供給し不要物を排出するので、一種の開放系と見ることができよう。ただし、生物由来の酵素の助けが必要であり、化学進化によって生成し得る非生物学的な素材を使って構成した系はまだ見あたらない。しかし、例えば化学工業プラントで用いられる槽型流通反応器や微生物の研究のための chemostat では、系への物質の導入・導出を連続的に扱うことができるが[4]、化学進化の実験ではほとんど用いられてこなかった。従ってRNAやタンパク質

の化学進化の研究でも、開放系という視点にてらして研究することが必要である。そのためには、適当な反応系を選び原料を追加し生成物から不要物を排出できる実験系を構築しなければならない。またこの種の実験系では反応系を開放系にする効果を調べるに足る十分な精度が必要である。

そこで本研究ではこの種の実験系を構築する研究の第一段階として、活性化ヌクレオチドを用いるオリゴヌクレオチドの鋳型指示反応[5]を使って、定期的に原料モノマーを供給する実験を行った。またこの反応系の各経路の速度定数を決定し、それらの値に基づいてモノマーを供給する効果をシミュレーションした。その結果、系内のヌクレオチドの塩基あたりの総濃度が一定に保たれる系ではモノマーを定期的に供給する効果は小さく、また系内のヌクレオチドの塩基あたりの総濃度が大きくなる系ではモノマーを添加する時間間隔を小さくするとオリゴヌクレオチドの生成量が少し増加した。さらに、これらの現象を計算機シミュレーションを用いて検証し、この反応系は開放系を構築するための素材として十分な精度と再現性を持っていることを明らかにした。

2. 実験およびシステムの設計

2. 1. 試薬

グアノシン 5'-モノリン酸 2-メチルイミダゾリド (2MeImpG) は既報の方法[6]に従って合成した。リボヌクレアーゼ A (RNaseA, Bovine Pancrease 起源 R-5500 Type VII-A) は SIGMA 社製のもの、およびポリシチジル酸 (polyC) は生化学工業社製のものを用いた。その他の試薬は全て特級品を用いた。

2. 2. 生成物の分析

生成物は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に陰イオン交換カラム (TOSOH, DNA-NPR, 4.6 mm×12.5 mm) あるいは逆相分配カラム (ODS-2, GL サイエンス, 4.6 mm×15 mm) をつけて分析した[7]。イオン交換 HPLC は、溶離液として A: pH=11.0 水溶液, B: 1.5 M NaCl, pH=11.0 を用い, B の割合が 20% (t = 0 min) から 100% (t = 70 min) となる直線グラジエントを用いて分析した。流速は 0.75 mL/min, カラム温度 35°C, 検出は 253 nm で行った。オリゴグアニル酸 (oligoG) の生成量はイオン交換 HPLC の結果から計算した。ただしこの方法では 2MeImpG, グアノシン 5'-モノリン酸 (5'pG), および polyC の分解生成物のシチジン 3'-モノリン酸 (C³p) を分離できない。そこで逆相分配 HPLC を用いて、溶離液として A: 0.005 M NaH₂PO₄, pH 3.5, B: 0.01 M NaH₂PO₄, 40% CH₃OH, pH 4.0 を用い, B の割合が 0% (t = 0 min) から 40% (t = 30 min), 100% (t = 45 min) となるように上記の装置のシステムコントローラーの 2 の曲線グラジエントを用いてこれらの成分を分析した。流速は 1.0 mL/min, カラム温度 35°C, 検出は 253 nm で行った。

2. 3. 鋳型指示反応

あらかじめ 2.59 mg のポリシチジル酸 (polyC) をプラスチックバイアルにとり 0.25 mL の蒸留水に溶かし, さらに 2.26 mg の 2MeImpG を加えて溶解した。この溶液に 2.0 M NaCl, 0.4 M MgCl₂, 0.2 M HEPES (pH = 8.0) を含む溶液 (HEPES buffer) を 0.25 mL 加えてよく攪拌し, ごく微小体積の塩酸あるいは水酸化ナトリウム溶液を加えて pH を 8.0 に調節した。この溶液には 0.01 M の 2MeImpG と 0.015 M の polyC, 1.0 M NaCl, 0.2 M MgCl₂, 0.1 M HEPES (pH = 8.0) が含まれる。同様にして 2MeImpG あるいは polyC の濃度が異なる溶液を調製した。これらの溶液を 25~50°C で 3 日間反応させた。試料を定期的に採取し液体窒素で瞬時に凍結した。反応後に溶液中の polyC を分解するために, 試料 0.03 mL に対して 0.0112 mL の RNaseA 溶液 (3600 unit) および 0.2 M EDTA 溶液 0.018 mL を加えて, 37°C で 18 h 間処理した。これを反応 A とする。

一方, これと同様の方法で調製した試料溶液を反応させ, 所定時間ごとに試料を採取した後に原料等を含む溶液を添加する以下のような実験を行った。

反応 B: 試料を 12 h ごとに 50 μ L 採取し, 0.01 M の 2MeImpG および 0.015 M polyC を含む溶液を 50 μ L 添加した。ここではグアニンのモノマー単位の濃度は一定であり, また他の成分の濃度も一定である。

反応 C1: 試料を 24 h ごとに 100 μ L 採取し,

0.02 M の 2MeImpG および 0.015 M polyC を含む溶液を 100 μ L 添加した。すなわち 2MeImpG 濃度は増加し, その他の成分の濃度は一定である。

反応 C2: 試料を 12 h ごとに 50 μ L 採取し, 0.02 M の 2MeImpG および 0.015 M polyC を含む溶液を 50 μ L 添加した。すなわち 2MeImpG 濃度は増加し, その他の成分の濃度は一定である。

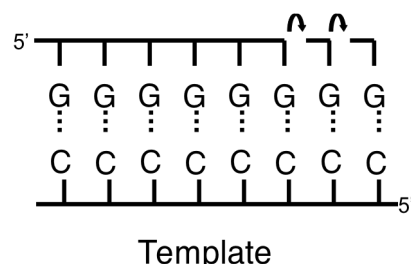
2. 4. 計算機シミュレーション

反応速度定数の決定および反応挙動のシミュレーションには SIMFIT[8]を用いた。

3. 結果および考察

3. 1. 鋳型指示反応を用いるモノマーを逐次供給する効果

鋳型指示反応 (Scheme 1) で原料を添加する効果を調べる条件として, 反応温度について検討した。鋳型指示反応は 25°C では約 3 日間で数 10% 進行するが, 反応が数時間で終了する程度の速さを持つ条件の方が追跡しやすい。そこで反応速度を少し高めるために 40°C および 50°C で鋳型指示反応を試みた。しかし反応効率は非常に低くなった。これは既報の 2MeImpG の鋳型指示反応の温度依存性の研究と一致している。ところが, Zn(II) 触媒存在下でグアノシン 5'-モノリン酸イミダゾリド (ImpG) から oligoG が生成する鋳型指示反応は 60°C でもかなり反応効率は高く, 本結果と異なっている[7]。2MeImpG をモノマーとして用いるときに反応効率が低くなる原因として以下の理由が考えられる。鋳型指示反応では 2~3 分子の活性化ヌクレオチドモノマーが鋳型 polyC 上に会合して配列し (Scheme 1), 鋳型上でそれらが縮合してリン酸ジエステル結合が生成する[9]。この会合はモノマー間の疎水性相互作用, π - π 相互作用および鋳型との水素結合からなると考えられるので, 温度上昇に伴ってこれらの相互作用が弱まるので鋳型指示反応の効率が低下すると予想される。一方, ImpG 系では Zn(II) の働きによってこれらモノマー間および伸長する oligoG との会合が補強され 2MeImpG 系よりも高温下で oligoG が効率よく生成したものと推定される。2MeImpG 系では Zn(II) を含まないのでこのような効果が弱く, 温度上昇によって反応効率が大きく減少したものと考えられる。これらの結果, 本研究では温度を 25°C とした。また, 鋳型指示反応の効率はモノマーと鋳型 polyC 濃度にも依存するので 2MeImpG を 0.005~0.015 M, polyC を 0.01~0.02 M の範囲で用いることとした。



Scheme 1

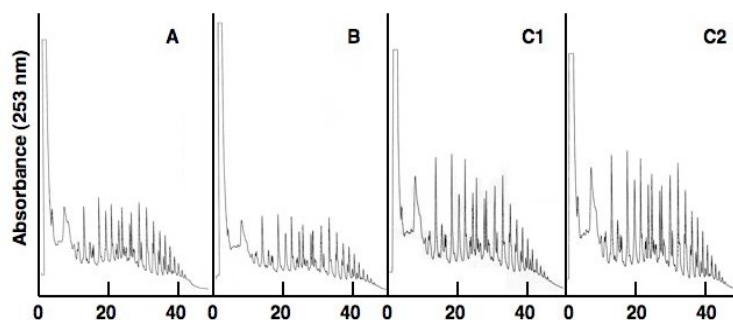


Fig. 1. Anion-exchange HPLC chromatograms for the template-directed reaction of oligoG on a polyC template.
Initial reaction conditions: [2MeImpG] = 0.01 M, [polyC] = 0.015 M, 1.0 M [NaCl] = 1.0 M, [MgCl₂] = 0.2 M, [HEPES] = 0.1 M, pH = 8.0.
A: control; B: A 50 μ L sample solution was withdrawn at every 12 h and then a 50 μ L solution containing 0.01 M 2MeImpG and 0.015 M polyC was added; C1: A 100 μ L sample solution was withdrawn at every 24 h and then a 100 μ L sample containing 0.02 M 2MeImpG and 0.015 M polyC was added; C2: A 50 μ L sample solution was withdrawn at every 12 h and then a 50 μ L sample containing 0.02 M 2MeImpG and 0.015 M polyC was added.

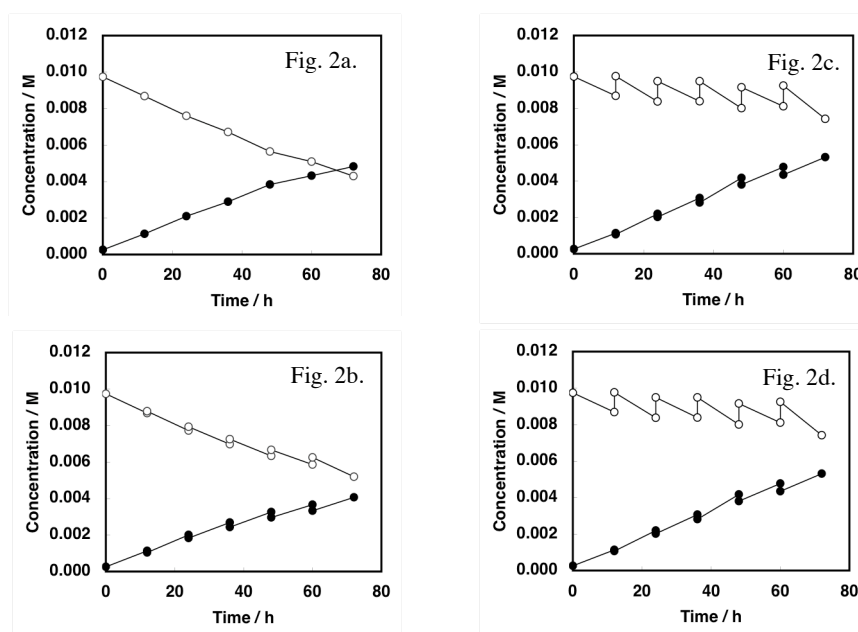


Fig. 2. Reaction curves for the template-directed reactions of oligoG on a polyC template.
Reaction conditions are the same as shown in Fig. 1.
a: reaction A, b: reaction B, c: reaction C1, d: reaction C2; open circles: 2MeImpG, closed circles: 5' pG.

これらの条件を考慮して実験項に示した条件下で鋳型指示反応を行った。イオン交換 HPLC によるクロマトグラムを Fig. 1a - 1d に示す。ここで、モノマーおよび polyC 濃度条件は既存の研究で用いられてきた代表的な条件よりも低いだが、oligoG は効率よく生成した。反応 A (Fig. 1a) は通常の鋳型指示反応で、反応 B (Fig. 1b) では反応溶液の 10% (50 μ L) を 12 h ごとに採取し、そのとき初期濃度の 2MeImpG (0.01 M) および polyC (0.015 M) を含む溶液を 50 μ L ずつ補充した。従って反応 B ではモノマー単位でのグアニン濃度は一定である。この 2 つの系では oligoG の生成量は反応 A でわずかに大きかった。一方、原料を供給する反応 C1 および C2 の両方で生成物の量は増加した (Fig. 1c, 1d)。C1 および C2 で

は 24 h あたりで外部から添加するモノマーの総量を同じとしたが、厳密には 24 h ごとではグアニンモノマー単位あたりの量は C1 の方が 0.23% 大きい。ただし本実験ではこの差は無視できる。さらに詳細に議論するためにこれらの HPLC による分析に基づいて、各反応経時変化を追跡した。2MeImpG の減少と 5' pG の生成 (Fig. 2a - 2d)、および oligoG の生成挙動を見るために 5mer, 10mer および 15mer の経時変化を調べた (Fig. 3a - 3c)。これらの結果から、反応 A および B においては鎖長が小さい oligoG の生成率は反応 B で反応 A よりもやや低く、鎖長が大きくなると反応 B の方が oligoG の生成率はやや高いという傾向が認められた。反応 B, C1, および C2 では 2MeImpG の減少 (Fig. 2b - 2d) において、

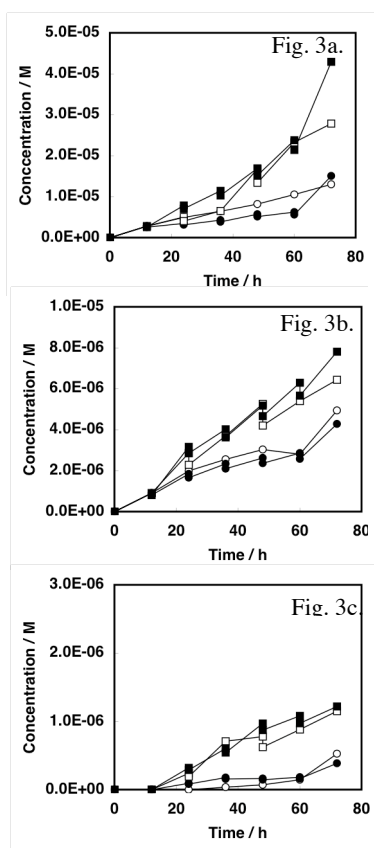


Fig. 3. Reaction curves for the template-directed reactions of oligoG on a polyC template. Reaction conditions are the same as shown in Fig. 1. a: formation of 5mer, b: formation of 10mer, c: formation of 15mer. Reactions: open circles: A, closed circles: B, open squares: C1, closed squares: C2 as shown in the caption of Fig. 1.

試料を採取して新たに外部から 2MeImpG を添加したことによって 2MeImpG 濃度が階段状の変化として現れている。反応時間が短い範囲では oligoG の生成量は、反応 C1 および C2 は反応 A および反応 B と比べてあまり違わなかったが、反応時間が 40 h 程度からは反応 C1 および C2 で大きくなった。反応 C1 および C2 の系ではモノマーを追加するので、ヌクレオチドの総濃度は増加するので oligoG の生成量が大きくなることは自然である。

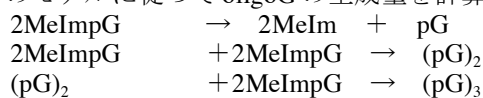
一方、24 h ごとに比べると反応 C1 と C2 では同量の 2MeImpG を追加したことになるが、生成量は反応 C2 の方が大きくなる傾向が認められる。これは、モノマーを逐次添加する時間間隔を変えると生成量が変わることであり興味深い。この現象は、反応 C1 および C2 と同様にして異なる濃度と周期で試料を採取しモノマーを追加した場合にも認められた。例えば 0.0125 M の 2MeImpG と 0.02 M の polyC を含む (他の塩類等の濃度は反応 C1 および C2 と同じ) 反応溶液 50

μL に対して、8 h ごとに試料を 0.05 mL 採取し 0.375 M の 2MeImpG と 0.02 M の polyC を 50 μL 加える (反応 D1), または、16 h ごとに試料を 100 μL 採取し 0.375 M の 2MeImpG と 0.02 M の polyC 溶液を 100 μL 加え (反応 D2), 反応挙動を追跡した。この場合の 4mer および 14mer の oligoG の生成量は反応 D1 で D2 よりも高く、上記の系での結果と同様であった。

以上のように、鋳型指示反応系ではヌクレオチドの塩基あたりの総濃度が一定の場合にはモノマーを供給すると oligoG の生成量がやや減少した。一方ヌクレオチドの塩基あたりの総濃度が增加する場合にはモノマーを定期的に追加しつつその時間間隔を小さくすると oligoG の生成量は増加した。しかしこれらの効果は微少であり、また本実験系は反応生成物の分析と解析が複雑なので、反応 B あるいは反応 C1 や C2 で実験によって認められた違いが妥当であるのかどうかについてさらに検証することが必要である。そこで、本実験を計算機シミュレーションして反応挙動を比較することにした。

3. 2. 計算機シミュレーションとの比較

上記の反応 A, B, C1, および C2 について以下のモデルに従って oligoG の生成量を計算した。



それぞれの過程の速度定数として Kanavarioti らの文献値[9], $k_{\text{hy}} = 6.4 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$, $k_2 = 0.11 \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $k_3 = 29.0 \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $k_4 = k_5 = \dots = k_{19} = 65 \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$ を最初に用いた。シミュレーションはなるべく鎖長の大きなものまでを定義した方が実験モデルに近くなると考えられるので[7], ここでは 19mer までを定義した。実験とそれに対応するシミュレーションの結果を比較したが、活性化ヌクレオチドの減少の傾向はよく一致したが、ほかの挙動はあまり一致しなかった。これは、鋳型指示反応の速度定数はヌクレオチドモノマー濃度、鋳型濃度や温度などの実験条件によって変化するためであると考えられる。そこで、反応 A の実験結果からこれらの速度定数を改めて SIMFIT で決定し、その値に基づいてシミュレーションを行うことにした。

得られた速度定数は, $k_{\text{hy}} = (9.43 \pm 0.01) \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$, $k_2 = (3.38 \pm 0.05) \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $k_3 = (5.72 \pm 0.18) \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $k_4 = k_5 = \dots = k_{19} = (19.6 \pm 0.9) \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$ であった。本実験で得られた速度定数と Kanavarioti らの結果を比較すると、2MeImpG の加水分解速度については両者は比較的近い値であったが、本実験で得た他の速度定数は Kanavarioti らの結果と比べて小さい傾向が認められた。本研究で得た速度定数を用いてシミュレーションした結果を Fig. 4a - 4d, および 5a - 5c に示す。2MeImpG の減少については実験値と計算値でかなり良く一致した。また oligoG の生成についても、5mer では計算値の方が小さい傾向が見られるが、他では生成挙動はおおむね良く一致した。

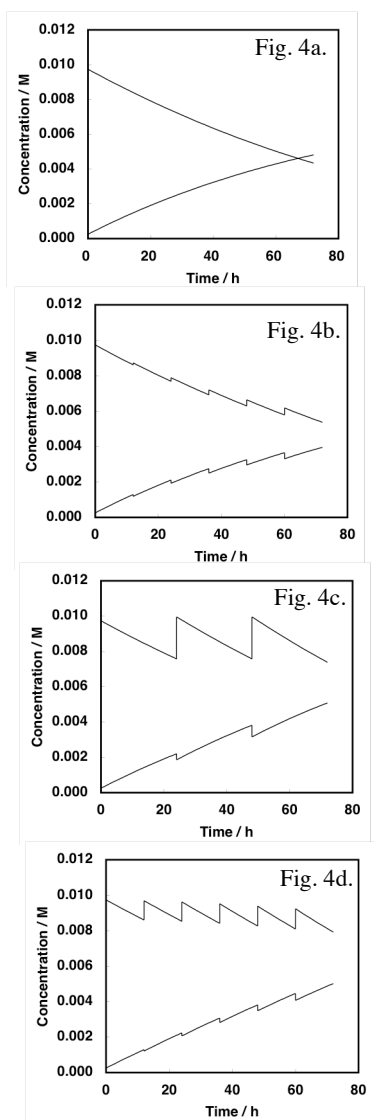


Fig. 4. Simulated reaction curves of the template-directed reactions corresponding to Fig. 2.

a: reaction A, b: reaction B, c: reaction C1, d: reaction C2; top lines at time 0: 2MeImpG, bottom lines at time 0: 5' pG.

ところで、計算機シミュレーションではある鎖長までの oligoG の生成をあらかじめ定義しなければならないが、実際の実験において oligoG の生成の鎖長の限界を定義することは無意味である。本モデルでは 4mer 以上の生成速度定数を一定と仮定したが、最長鎖長 (19mer) の oligoG は伸長反応が定義されないため生成量が増大する傾向がある。すなわち、4mer 以上の生成速度を一定としてシミュレーションする場合には鎖長の増加とともに oligoG の量は減少するが、19mer の生成量だけは 18mer よりも大きくなる傾向がある。しかし、本系では上述のように長い鎖長までを仮定してシミュレーションすることでその影響を小さくすることができた。oligoG の生成量は、反応 C2>C1>A>B の順序で減少しておりこの傾向は実験値と計算値で一致した。特に、A と B、あるいは C1 と C2 の違いは小さいにも関わらず、計算でその傾向を再現できたことは本研究の実験結果および実験モデルの解析法とシミュレーションが妥当であることを示している。

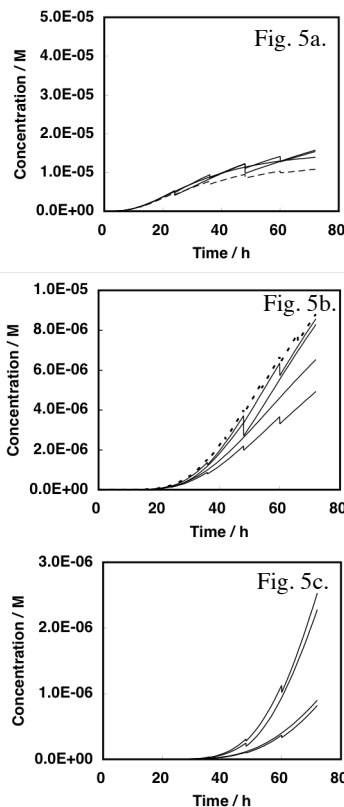


Fig. 5. Simulated reaction curves of the template-directed reactions corresponding to Fig. 3.

a: formation of 5mer, b: formation of 10mer, c: formation of 15mer. Solid lines from top to bottom: a: C1, C2, A, B; b and c: C2, C1, A, B; dashed line in b: reaction conditions are the same as C1 and C2, but the interval period is 6 h.

ユレーションが妥当であることを示している。すなわち oligoG の生成量は、試料を採取してつぎ足す時間間隔を短くすると 12 h ごとにつぎ足した方が 24 h ごとにつぎ足すよりもわずかに大きくなることをシミュレーションで検証できた。同時に、計算によってもっとデリケートな予測をすることも可能であることを示唆している。そこで、C1 および C2 と同じ反応系で採取と添加のタイミングを 6 h にした場合のシミュレーションを行った。その結果、6 h の場合には 12 h 間隔で原料を追加する場合よりもさらに oligoG の生成量が大きいことが予測された (Fig. 5b 点線)。この事実は、時間間隔を小さくする、すなわち連続的に原料を供給し排出する場合に oligoG の生成量はさらに増加する可能性を示唆している。

一方、反応 B では実験では oligoG の生成量は反応 A に比べて小さくなることが認められたが、これはヌクレオチドの塩基あたりの総濃度が一定に保たれていても、モノマーを逐次供給して生成物を除去する系では oligoG の生成効率が低くなることを示唆している。そこで、定期的にモノマーを加えるときの時間間隔を変えて oligoG の生成量がどのように変化するかを計算機シミュレーションで調べた (Fig. 6a - 6c)。逐次モノマーを添加する時間間隔を、0 h, 36 h, 24 h, および 12 h として計算し比較した (Fig. 6a - 6c のそれぞれ

れ細い点線, 細い実線, 太い点線, 太い実線). その結果, 時間間隔を大きくした方が所定時間ごとの oligoG の生成量は大きくなる事が予測された. 15mer では添加する時間間隔による違いは非常に小さくなった. これらは反応 C1 および C2 の場合とは一見異なる傾向である. ヌクレオチドの総濃度が一定に保たれる場合には, モノマーを添加することで oligoG の生成量が増加する効果よりも, 生成した oligoG を系から取り除く効果の方が大きいことを示している. 従って, 反応 B においてモノマーを添加する時間間隔を無限小にした場合, すなわち連続的な完全混合反応槽において供給されるモノマー溶液が反応溶液と同じで, かつ供給と排出の流速が同じ場合には, oligoG の生成量は小さくなることを示唆している.

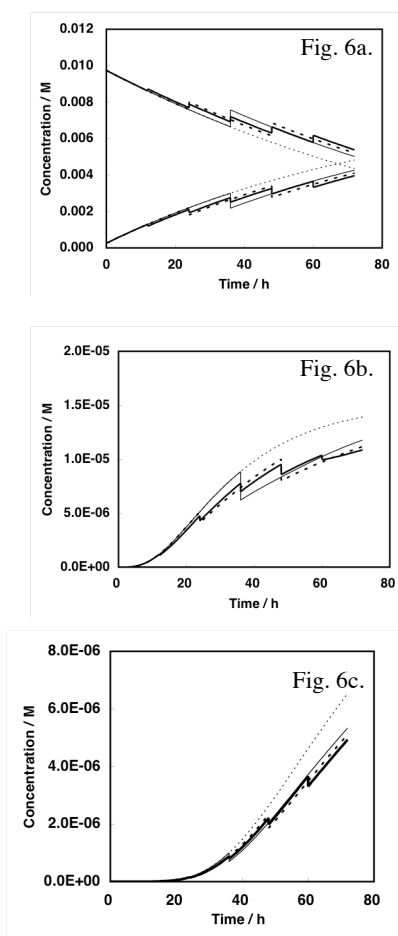


Fig. 6. Simulated reaction curves of the the template-directed reactions corresponding to Fig. 2a and 2b and its variations.

a: disappearance of 2MeImpG and formation of pG, b: formation of 5mer, c: formation of 10mer.

Lines: thin dashed lines: no monomer was added; solid lines: a 150 μ L sample solution was withdrawn at every 36 h and then a 150 μ L solution containing 0.01 M 2MeImpG and 0.015 M polyC was added; bold dashed lines: a 100 μ L sample solution was withdrawn at every 24 h and then a 100 μ L solution containing 0.01 M 2MeImpG and 0.015 M polyC was added; bold solid lines: reaction B.

3. 3. まとめと今後の課題

以上の実験とシミュレーションによって本鋳型指示反応を用いて原料をつぎ足す反応について以下のことが分かった. また, 開放系で鋳型指示反応をする場合の問題点も予測された.

1) モノマーを定期的に供給し生成物を含む溶液を排出するとき, ヌクレオチドの塩基あたりの総濃度が一定に保たれるとき, oligoG の生成量は小さくなる. また供給する時間間隔を小さくすると oligoG の生成量はより小さくなる.

2) 同様にして, 原料モノマーを定期的に供給しヌクレオチドの塩基あたりの総濃度が大きくなるときには, 鎖長の大きな oligoG の生成量は増加する. oligoG の生成量の増加はヌクレオチドの全体量の増加に伴うものであるが, その場合には試料を採取しモノマーを追加する時間間隔を小さくするほど oligoG の生成量は大きくなった.

3) 計算機シミュレーションではオリゴヌクレオチドの生成はある鎖長までしか定義できないという問題があるが, シミュレーションで定義する鎖長を大きくすることでほぼ解決できる.

4) 反応系にモノマーなどを逐次供給する効果を実験によって識別できることが分かった. しかし, 本研究で示した反応 A と反応 B の違いや, 反応 C1 と反応 C2 の違いは微小である. 従って, フロー系などのより複雑な系の挙動を調べる場合には実験とシミュレーションを併用して評価することが望ましいことを知った.

謝辞

SIMFIT は von Kiedrowsiki 教授にいただきました. ここに謝意を表します.

引用文献

1. Miller, S. L. A production of amino acids under possible primitive earth conditions, *Science* 117, 528-529 (1953).
2. Imai, E., Honda, H., Hatori, K., Brack, A. and Matsuno, K. Elongation of oligopeptides in a simulated submarine hydrothermal system, *Science* 283, 831-833 (1999).
3. Ferris, J. P., Hill, A. R., Liu, R. H. and Orgel, L. E. Synthesis of long prebiotic oligomers on mineral surfaces *Source, Nature* 381, 59-61 (1996).
4. Küppers, B. Phänotypische information von nukleinsäuren: Die initiations-signale für die RNA-replikation durch die Q β -replikase, *Ber. Bunsen-Gesellschaft* 80, 1149-1153 (1976); Husimi, Y., Nishigaki, K., Kinoshita, Y. and Tanaka, T. Cellstat - A continuous culture system of a bacteriophage for the study of the mutation-rate and the selection process at the dna level, *Rev. Sci. Instruments* 53, 517-522 (1982); Eigen, M. Stages of emergence of life - Five principles of early organization, *J. Mol. Evol.* 19, 47-61 (1982); Schuster, P. and Sigmund, K. Dynamics of evolutionary optimization, *Ber. Bunsenger. Phys. Chem.* 89, 668, 682 (1985); Husimi, Y. and Keweloh, H. C. continuous culture of bacteriophage Q β using a cellstat with a bubble wall-growth scraper, *Rev. Sci. Instruments* 58, 1109-1111 (1987); Schuster, P. RNA based evolutionary optimization, *Origins Life. Evol. Biosphere* 23, 373-391 (1993); Schwienhorst, A., Lindemann, B. F. and Eigen, M. Growth kinetics of a bacteriophage in continuous culture, *Biotech. Bioeng.* 50, 217-221 (1996).
5. Inoue, T. and Orgel, L. E. Oligomerization of (guanosine^{5'}-phosphor)-2-methylimidazole on polyC, *An RNA polymerase model, J. Mol. Biol.* 162, 201-217 (1982); Inoue, T. and Orgel, L. E. A nonenzymatic RNA polymerase model, *Science* 219, 859-862 (1983).
6. Joyce, G. F., Inoue, T. and Orgel, L. E. Non-enzymatic template-directed synthesis of RNA random copolymers, Poly(C,U) templates, *J. Mol. Evol.* 176, 278-306 (1984); J. P.

- Ferris, J. P. and G. Ertem, G. Oligomerization reactions of ribonucleotides: The reaction of the 5'-phosphorimidazolide of nucleotides on motmorillonite and other minerals, *Origins Life Evol. Biosphere*, 22, 369-381 (1992).
7. Kawamura, K. and Umehara, M. Kinetic analysis of the temperature dependence of the template-directed formation of oligoguanylate from the 5'-phosphorimidazolide of guanosine on a polyC template with Zn^{2+} , *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 74, 927-935 (2001).
 8. Terfort, A. and von Kiedrowski, G. Self-replication by condensation of 3-amino-benzamidines and 2-formylphenoxyacetic acids, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 31, 654-656(1992).
 9. Kanavarioti, A., Bernasconi, C. F., Alberas, D. J., and Baird, E. E. Kinetic dissection of individual steps in polyC-directed oligoguanylate synthesis from guanosine 5'-monophosphate 2-methylimidazolide, *J. Am. Chem. Soc.* 115, 8537-8546(1993).