

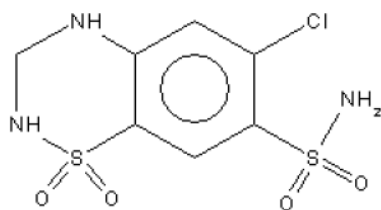
このチュートリアルは、英国 Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC)が作成しております粉末結晶構造解析ソフト DASH の使い方を紹介するもので、結晶解析の基本知識をお持ちでいらっしゃることを想定しております。(DASH3.2 付属の Tutorial 1 を一部改訂し、和訳しておりますので、異なる version をお使いの場合は、画面や機能など異なる場合がございます) DASH を正式にライセンスしたい方は、日本総代理店である化学情報協会までご連絡ください。アカデミックライセンスを希望されます場合は、CSD とセットで配布されておりますので、大阪大学蛋白質研究所までご相談ください。

## 目次

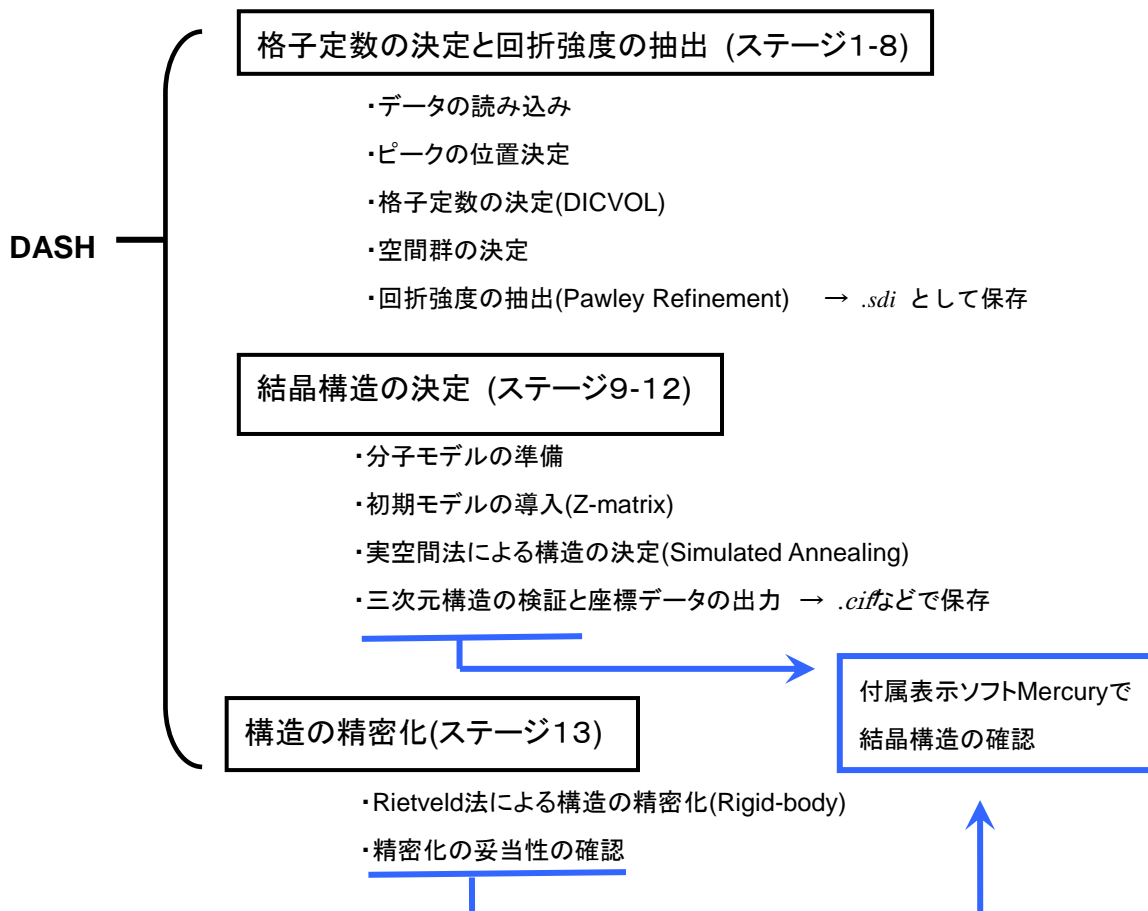
はじめに .....	1
解析の流れ .....	2
データ .....	2
ステージ 1: データの読み込み .....	2
ステージ 2: データの検討 .....	4
ステージ 3: ピークのフィッティングによる正確なピーク位置の決定 .....	6
ステージ 4: 指数付け .....	10
ステージ 5: 次のステージに進む前に .....	11
ステージ 6: 格子定数のチェックと空間群の決定 .....	12
ステージ 7: 回折強度の抽出 .....	14
ステージ 8: 空間群を決定する別の方法 .....	18
ステージ 9: 分子構造モデルの組み立て .....	19
ステージ 10: 構造決定の準備 .....	21
ステージ 11: 構造決定計算の追跡 .....	24
ステージ 12: 出力された構造の検討 .....	26
ステージ 13: Rietveld 法による精密化 .....	27
参考文献 .....	32

## はじめに

チュートリアル 1 では、hydrochlorothiazide(I)分子を例として、結晶構造を決定する手順を解説します。ここでは解析手順を詳しく説明しますが、チュートリアル 2 以降では、手順については簡素化し、結晶解析の応用例を説明します。まず、このチュートリアルで使い方を覚えてください。初心者ならば 2 時間程度、粉末結晶法の経験者ならばもっと短い時間で完了します。



## 解析の流れ



## データ

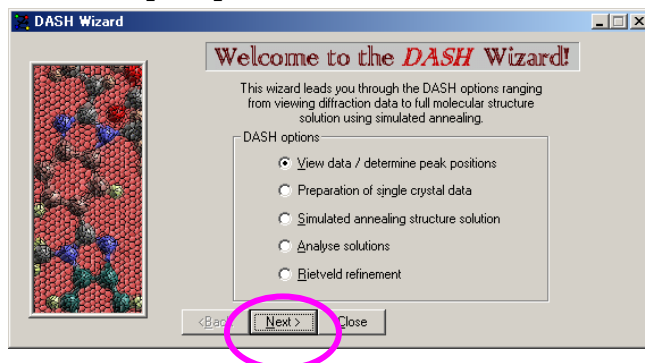
データセット *Tutorial\_1.xye* は, Brookhaven National Synchrotron Light Source のビームライン X7A を使い 20 K で測定した放射光 X 線回折データです. X 線の波長は 1.1294 Å で, 0.7 mm のガラスキャピラリーに詰めた試料を使用しています.

### ステージ 1: データの読み込み

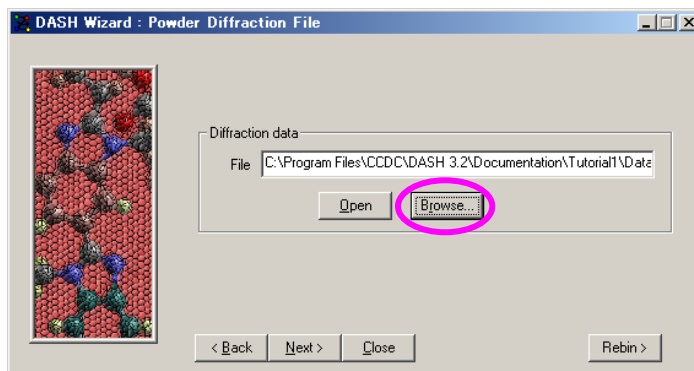
DASH のアイコンをダブルクリックして DASH を起動します.

DASH ウィザードに従って構造解析を進めます. データの読み込みは, 次の順番で行います.

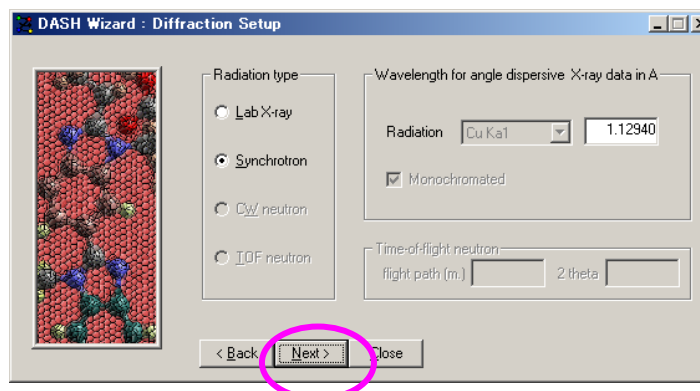
- **View data / determine peak positions** を選択し, **Next >** をクリックします.



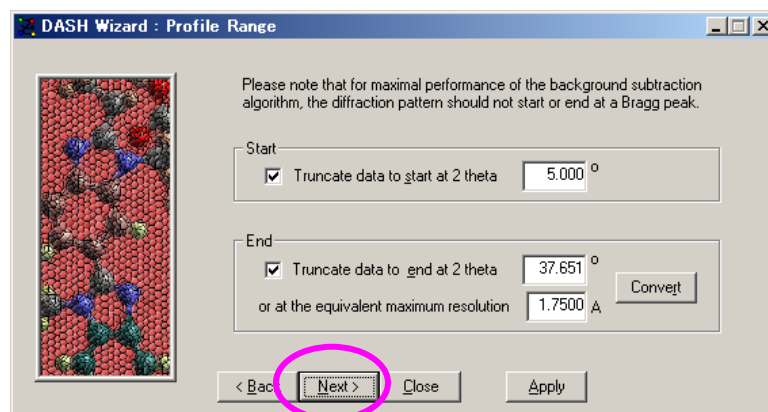
- **Browse...** ボタンをクリックします。
- 回折ファイル *Tutorial\_1.xye* (例えば *C:\Program Files\CCDC\DASH 3.2\Documentation\Tutorial1\Data files*) を選択し、**Open** (日本語 OS の場合、**開く**) をクリックして回折データを DASH に読み込みます。 [その他、読み込めるファイルフォーマットにつきましては、Documentation をご参照ください]



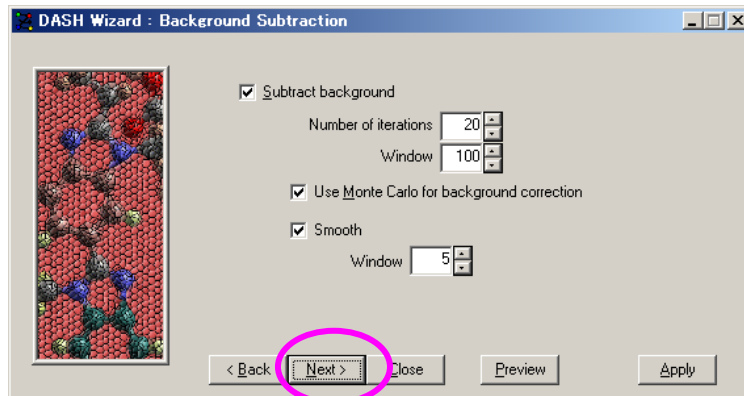
- データが DASH に読み込まれたら、**Next >** をクリックします。
- X 線の波長と線源の設定が正しいことを確認して **Next >** をクリックします。



- データを分解能 1.75 Å で打ち切り、**Next >** をクリックします。



- この例のような簡単なバックグラウンドに対しては、*Background Subtraction* ウィンドウに示されているデフォルト設定で十分です。 **Next >** をクリックします。



## ステージ 2: データの検討

このステージはデータの説明のみです。粉末回折法のデータの取り扱いに慣れていらっしゃる方は**ステージ 3**に進んでください。

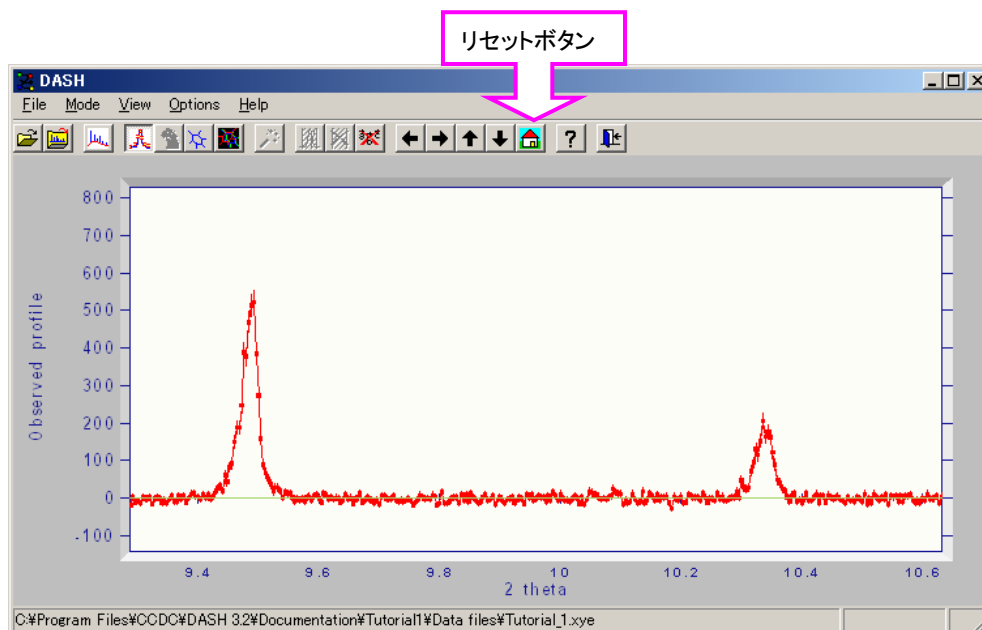
.xye フォーマットは、DASH オリジナルの形式です。Tutorial\_1.xye をワードパッドなどの ASCII 形式テキストエディタで開くと、フォーマットが確認できます。1 行目に波長の値 1.1294(Å), 2 行目以降に 2θ, 回折強度, 強度の標準偏差(偏差の値がなくとも DASH で読み込めます)が示されます。ここで使用するデータは回折角 2θ の値で 5~44°の範囲にわたっています。

データは 3 つの列からなります。

```
1.1294    ← 波長
  5.000 81.96 10.952
  5.004 71.25 10.284
  ...
<中略>
  ...
43.996 69.55 3.572
44.000 68.28 3.540
```

1 列目 x = 2θ の値 2 列目 y = 回折強度(カウント) 3 列目 e = 強度の標準偏差
---

DASH に表示された回折データを拡大してみましょう。拡大の方法で最も簡単なのはマウスの左ボタンを用いることです。左ボタンを押したままマウスをドラッグし、拡大したい範囲を長方形で指定します。全体の表示に戻りたい場合はキーボードの **Home** キーを押すだけで実行できます(リセットするには画面の上の「家」のアイコンをクリックするなど、拡大・縮小の方法は他にもあります。詳細については **Documentation** を参照してください)。それでは下図のように  $2\theta = 10^\circ$  のすぐ両隣にある 2 つのピークを拡大してみてください。



左右カーソルキーを用いて、表示する  $2\theta$  の領域を移動することができます。その他の便利なキーボードショートカットとして次のものがあります。

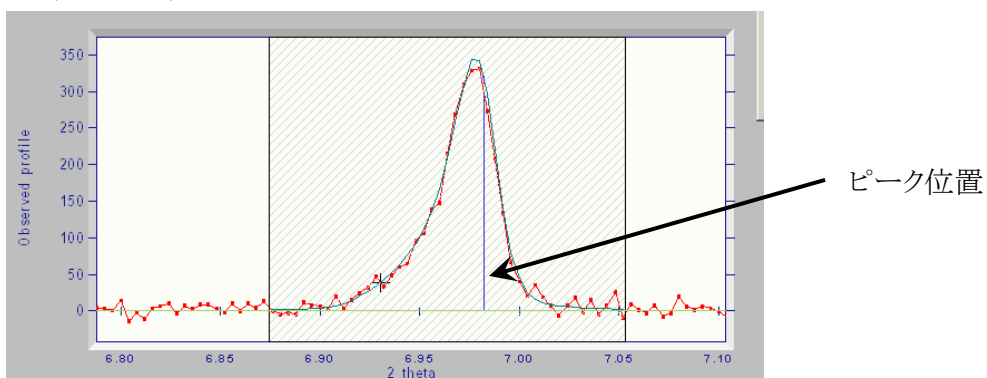
- Shift - ↑** : (表示範囲の)拡大
- Shift - ↓** : (表示範囲の)縮小
- Ctrl - ↑** : 現在の表示範囲でのピークの最大値に合わせて y 軸を調整

下記に注目しつつデータを見てください。

- 低角側では軸発散のため、ピークが左に尾を引いた非対称形となっています。
- バックグラウンドが平であることは、アモルファス成分が含まれていないことを示します。
- ピークが鋭いことは、結晶性のよい試料であることを示します。
- 装置の分解能は極めて優れています。たとえば  $2\theta = 12.17^\circ$  前後の二重ピークを参照してください。
- 装置の分解能とピークの鋭さに対して測定のステップ幅を十分に細かく取っており、ピーク毎に十分な測定点があります。



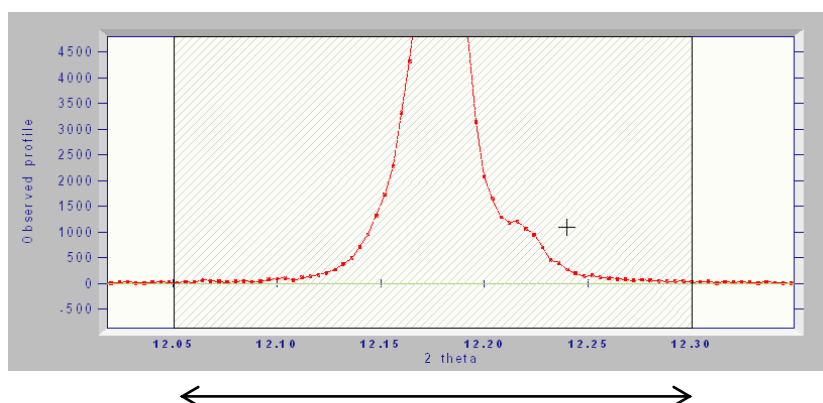
- カーソルを網掛け部分の中に置いて **Return (Enter)** キーを押すと、ピークへの曲線のフィッティングが行われます。



- 緑色の実線[見難い]はデータにフィッティングした曲線を示し、青色の垂直線はピーク位置を示します。 **View** メニューで **Peak Positions** を選択すると、正確なピーク位置(下図参照)を確認することができます。

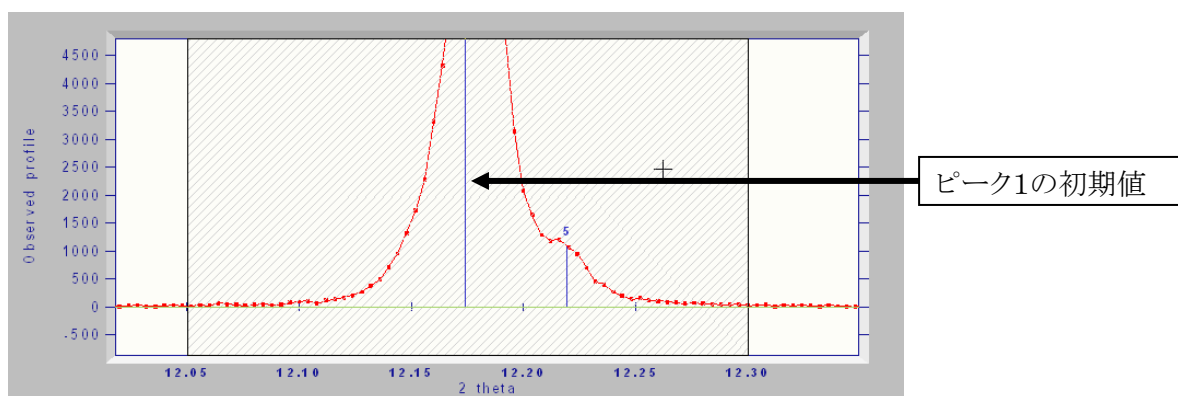
Diffraction Setup		Peak Positions	Cel
	Position	Esd	T
1	6.9827	0.0013	

- この値[位置]と完全に一致する必要はありませんが、ごく近い値になるはずです。
- 同様にして、 $2\theta = 9.5^\circ$  および  $10.3^\circ$  付近の2つのピークへのフィッティングを行います。
- $2\theta = 12.17^\circ$  の二重ピークを拡大します。ピークの形から、ここでは2つの反射が重なっていることがわかります。
- マウスの右ボタンを用いて、2つのピークを含む範囲をドラッグし選択します。

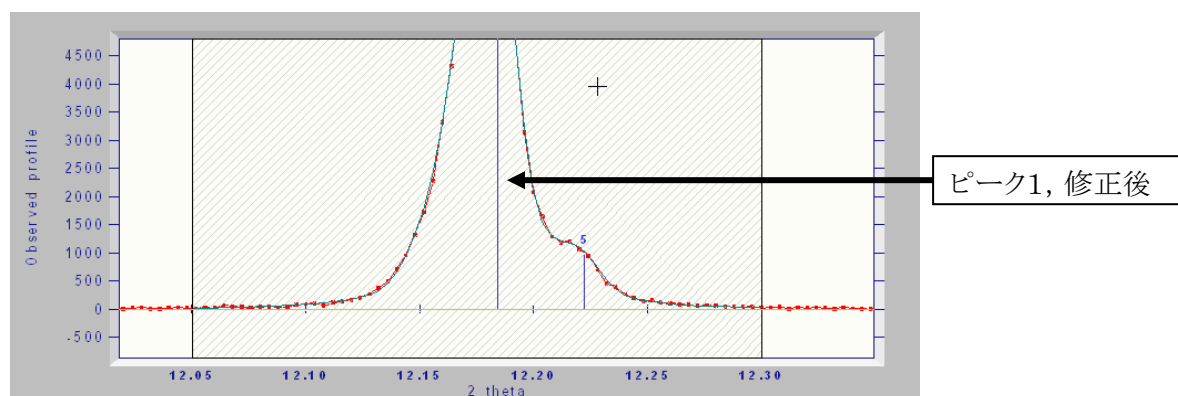


網がかかっています

- ここでまず2つのピーク位置の初期値を決めます。カーソルを第1のピークの頂点付近に置き、キーボードの数字の**1**を押して、第1ピークの位置を決め、ついで第2のピークの頂点付近に移り、数字の**2**を押して第2ピークの位置を決めます。それぞれのピーク位置を青色の実線で表示します。



- 次に前と同様にしてカーソルを網掛け部分の中に置き、**Enter (Return)**を押すと2つのピークへのフィッティングが実行されます。このときピーク位置がデータに最もよくフィットするように初期値を修正します。[下図参照：上図と比較してピーク位置が若干高角側に修正されています]





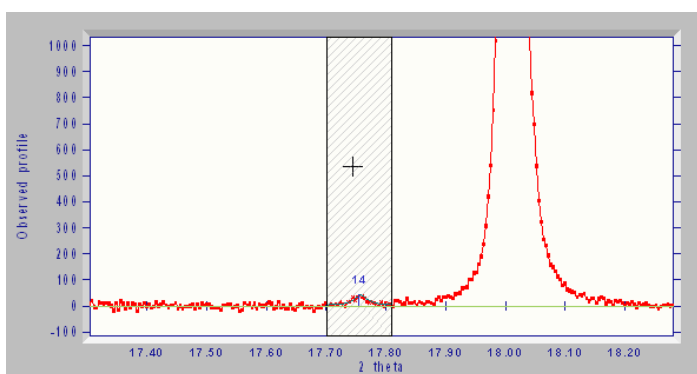
- 以下同様にして、合計 20 本程度のピークの正確な位置を求めます。目安として、それぞれの  $2\theta$  の範囲で以下の本数のピークの位置を決めてください。

$2\theta$ の範囲(°)	範囲内のピーク数	累計ピーク数
13.5 未満	5	5
13.5～14.6	3	8
14.6～16.4	4	12
16.4～17.5	1	13
17.5～18.5	2	15
18.5～20	4	19
20～20.9	3	22
20.9～21.3	2	24

- View** メニューで **Peak Positions** を選択して、最初の 24 本のピークを表示すると以下に近い値になっているかと思えます。

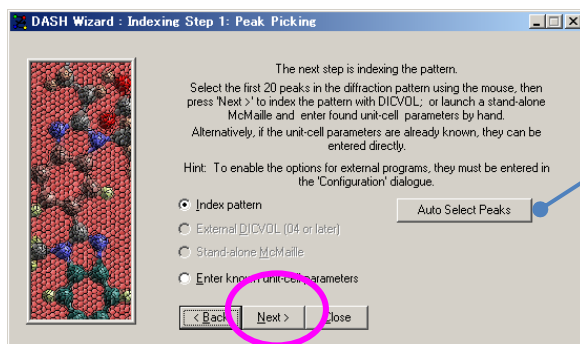
6.9822	9.4942	10.3453	12.1847	12.2228
13.6925	13.7905	14.0003	15.2696	15.6883
15.7753	15.9581	16.8146	17.7552	18.0107
19.0501	19.1452	19.3479	19.7249	20.5468
20.6314	20.7735	21.0639	21.1688	

- $2\theta = 17.75^\circ$  付近のピークだけは非常に弱く、見つけにくいかもしれません。



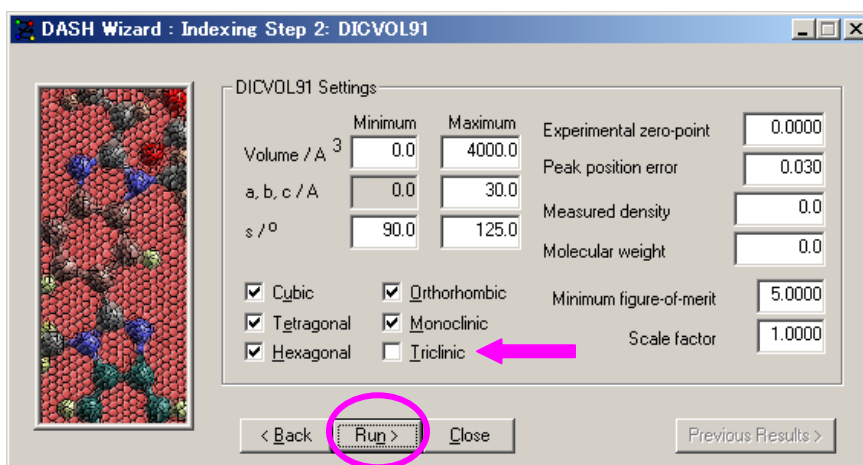
## ステージ 4： 指数付け

- 20 本前後のピークを選択したら、回折パターンの指数付けを行います。このステージでは、いくつかのオプションがあります。DASH に内蔵されている DICVOL91、外部プログラム (McMalle や DICVOL04 など) または、単位格子がわかっているようであれば、その値を使うことができます。[外部プログラムを使用する場合には、Options → Configuration で、プログラムの path を指定しておく必要があります] ここでは、内蔵されている DICVOL を使用することとし、**ステージ 3** の続きで DASH のウィザードは、**Index pattern** が選択されているので、**Indexing Step 1: Peak Picking** のウィンドウの **Next >** をクリックします。



このボタンを使うと自動でピークを拾いますが、今回は手動の操作に慣れてください。

- 三斜晶系以外のすべての晶系を選択していることを確認します。[実際の系で、三斜晶系の可能性がある場合は、三斜晶系も選択してください。三斜晶系を選択すると計算時間が長くなります]



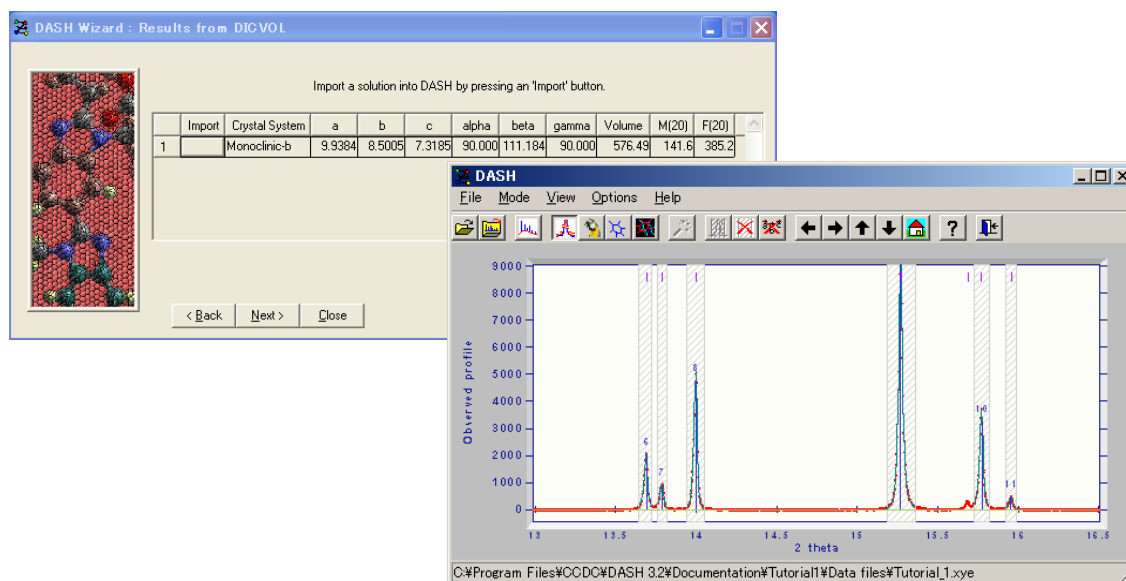
- Run >** を選択して、指数付けプログラム DICVOL を実行します (DICVOL 以外で粉末回折パターンの指数付けを行いたい場合は、次の URL にソフトウェアの一覧表があります。<http://www.ccp14.ac.uk/solution/indexing/>).

### [参考]

DASH で求めたピーク位置を他の指数付けプログラムで利用する場合には、次のようにしてファイルに出力することができます。

- **View** メニューで **Peak Positions** を選択し、ピーク位置の列の表頭の文字 **Position** をクリックし列全体を選択します。
- **Ctrl + C** で列全体をクリップボードにコピーします。
- 適当なエディタ(メモ帳, ワードパッドなど)を開き, **Ctrl + V** で列を貼り付けます。
- ピークの位置を, 使いたい自動指数付けプログラムに合ったフォーマットで保存します。

指数付けの結果は, 格子体積が約  $576 \text{ \AA}^3$  の単斜晶系となるはずですが。



前のステージで示したピークに非常に近いピークを選択した場合, DICVOL の典型的な結果は, 次のパラメータを持つ単斜晶系の格子となります。

$$a = 9.9384 \text{ \AA}, b = 8.5005 \text{ \AA}, c = 7.3185 \text{ \AA}, \beta = 111.184^\circ, V = 576.49 \text{ \AA}^3$$

$$\text{Figure of merit: } M(20) = 141.6, F(20) = 385.2$$

Figure of merit がこのように大きい場合は, 正しい単位格子による指数付けを行なっていると考えてまず間違いありません(M は大きいほどよい). この単位格子を慣習的な格子のとり方に変換することも可能ですが, ここでは DICVOL の結果のままにしておきます。

### ステージ 5: 次のステージに進む前に

この単位格子に矛盾はないでしょうか. 分子体積の粗い近似法として, C, N, O 原子に  $15 \text{ \AA}^3$ , Cl, S に  $25 \text{ \AA}^3$ , 水素に  $5 \text{ \AA}^3$  を割り当てる方法があります. この分子  $\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2\text{Cl}$  にこれを適用すると, 推定される分子体積は  $275 \text{ \AA}^3$  となり, 単位格子 1 個あたり 2 分子があるとなれば, 単位格子

の体積は約  $550 \text{ \AA}^3$  となります。DICVOL で得た単位格子体積  $576 \text{ \AA}^3$  は、単位格子あたり 2 分子がある事を示し、単斜晶系とすれば  $Z = 2$  である空間群  $P2_1$  が確からしいものと考えられます。

## ステージ 6： 格子定数のチェックと空間群の決定

- *Results from DICVOL* ウィンドウの一番上の候補の *Import* 欄にあるボタン[グレーのボックス, 見難いので]を押し、回折ピークの表示されている *DASH* ウィンドウに計算値(反射の位置)を表示させます。候補が 1 件だけであれば自動的に計算値が *DASH* ウィンドウに反映されます。

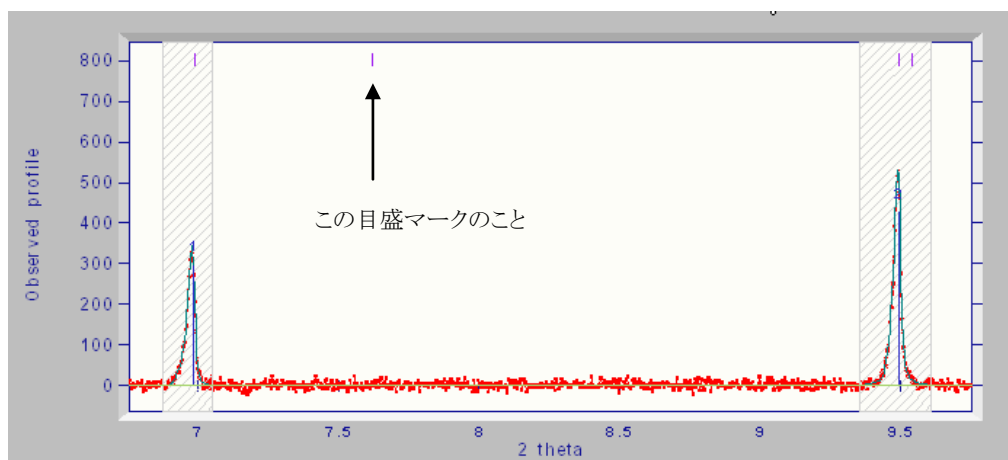
Import a solution into DASH by pressing an 'Import' button.

	Import	Crystal System	a	b	c	alpha	beta	gamma	Volume	M(20)	F(20)
1	<input type="button" value="Import"/>	Monoclinic-b	9.9384	8.5005	7.3185	90.000	111.184	90.000	576.49	141.6	385.2

- *Results from DICVOL* ウィンドウの **Next >** をクリックします。

回折データは以前と同様に表示されていますが、グラフ上部に目盛マークが入っている点が異なります。この目盛マークは入力した単位格子に対応する Bragg 反射の位置を示します。

- 初めに、全体的に目盛マークが回折パターン全ピークに対応していることを確認します。
- 対応しないピークがあるときは、求めた単位格子が正しくないか、または不純物相が存在する可能性があります。
- *Tutorial\_1.xye* のパターンをざっと見ると、目盛マークに対応しないピークはありませんが、余分な目盛マークが数本あります。一例を次の図に示します。

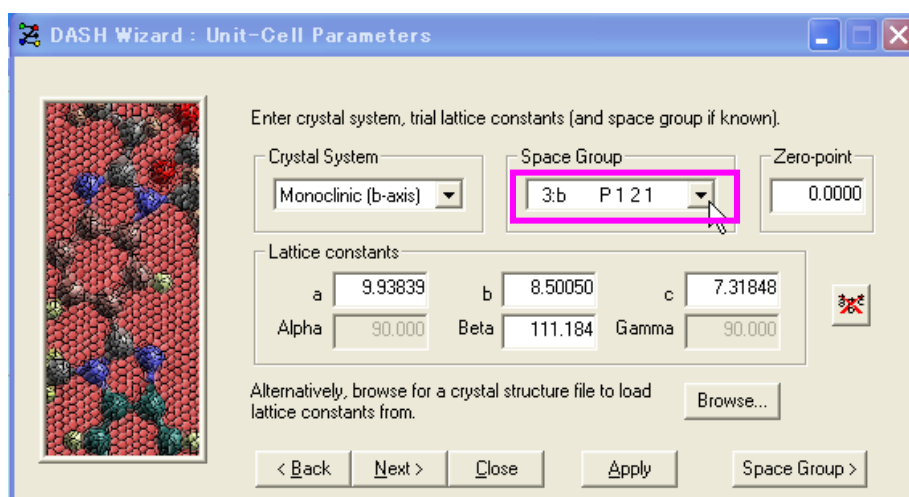


- $2\theta = 7.5^\circ$  のやや高角側にある目盛マークに対応する位置には、バックグラウンド以外にピークはないように思われます。これは真の空間群による消滅則で消えている反射でしょう。

- $2\theta = 9.5^\circ$ のやや高角側にある目盛マークにも対応するピークがありませんが、強いピークにショルダーらしいものが見られます。

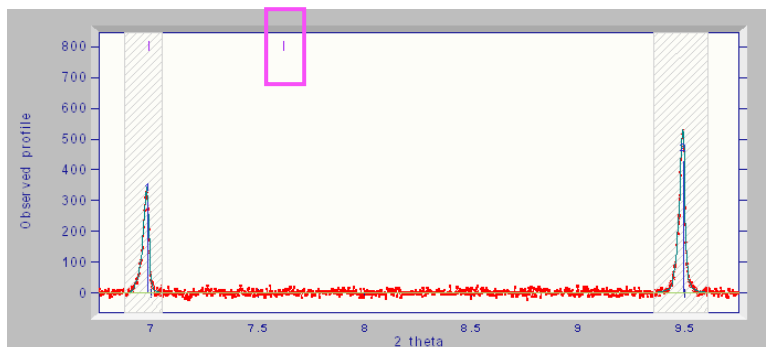
【コメント】ステージ 6 のここから先は、空間群の候補が少ない場合を例としています。実際の系で、空間群の候補が多い場合、または空間群の見当がつかない場合は、**ステージ 8** へ進んでください。

- (検討する空間群が少ない場合、このまま続けてください) 前に確からしい空間群として、すでに  $P2_1$  を考えたので、ここで  $P2$  から  $P2_1$  へ対称性を高めたとき、目盛マークのつかないピークが現れることなく余分な目盛マークがなくなるかどうかを見ることにします。
- 各空間群の確認は、*Unit Cell Parameters* ウィンドウで **Space Group** プルダウンメニューから確認したい空間群を選択します。



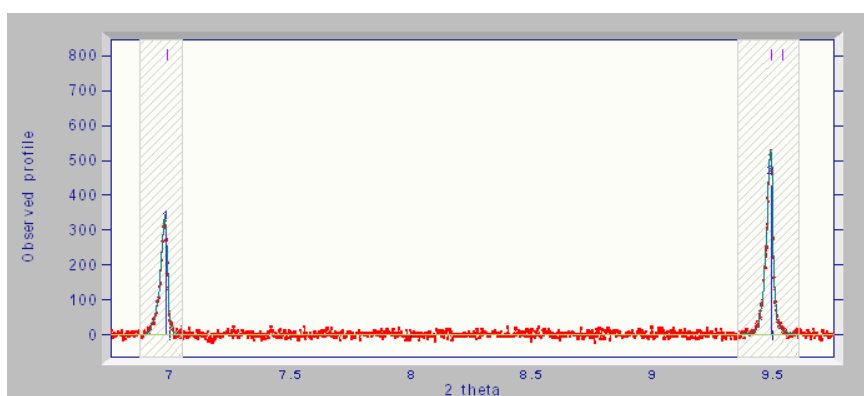
- 下向き矢印ボタンを用いてリスト下方の空間群を選択すると、その空間群に対応する反射位置に目盛マークの表示が変化するのがわかります。マウスでスクロールダウンして空間群を選択することもできます。
- たとえば、 $P1c1$  のような空間群を選択すると  $2\theta = 9.5^\circ$  の主要なピークに対応する目盛マークが消えるので明らかに不適切です。

空間群  $P1c1$  に対する目盛マーク:



- そして、第一候補の空間群  $P12_11$  では  $2\theta = 7.5^\circ$  の目盛マークが消え、 $2\theta = 9.5^\circ$  のマークは残ります。

$P12_11$  に対する目盛マーク:



- 回折パターンの子の部分を検討すると、目盛マークとピークの対応は良好で、 $2\theta = 9.5^\circ$  のやや高角にあるピークは空間群  $P2_1$  ( $b$  軸を主軸とする) に属する結晶の極めて弱い回折線と結論することができます。
- 空間群  $P2_1$  を選択して **Apply** をクリックします。
- **Next >** をクリックし、**ステージ 7** に進んでください。

### ステージ 7: 回折強度の抽出

このステージの最初の部分は指数付けの過程とほぼ同様です。回折パターン全体のモデル化を行うため、個々のピークのフィッティングを行う必要があります。すでにかなり正確な格子定数と正しい空間群が得られていると考えられます。ピークのフィッティングは、指数付けのときと少々異なり、下記のようになっています。

- 複数の、なるべく孤立したピークを使ってフィッティングを行います。
- 回折パターン全体にわたってピーク形状をパラメータ化するため、パターン全体からまんべんなくピークを拾います。
- 低角の反射で、ピークの非対称化がモデル化されているかどうか確認します。

*Pawley Refinement Step 1*: まず指数付けのときに選択したピークをリセットするために *Peak Picking* ウィンドウで **Clear Peaks** を選択します。今回の回折パターンで選択するのに適当なピークの例を下に掲げます。前述と同様にして、ピークを順にマウスの右ボタンでドラッグして選択します。

ピーク	大体のピーク位置	注釈
1	6.97	
2	9.49	
3	14.0	<sup>1</sup> Pawley 法による精密化のオプション
4	16.8	
5	20.78	
6	22.75	<sup>2</sup> 格子パラメータ精密化開始
7	27.8	
8	31.85	<sup>3</sup> Pawley ウィンドウ表示

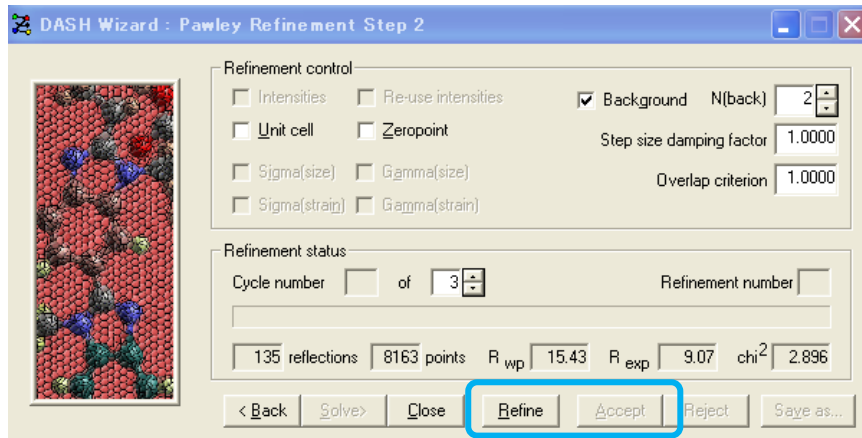
1) 3本のピークのフィッティングが終了すると、プロファイルの精密化に直接進むことができるようになります。この場合は次のアイコンを押してください。



**Mode**メニューで **Pawley Refinement** を選択することもできますが、さしあたりこの方法は無視します。

2) 6本のピークのフィッティングが終了すると、DASH は格子パラメータ(4つのパラメータとゼロ点)の精密化を行うのに十分な情報を取得したことになります。精密化の結果は **View** メニューで **Peak Positions** を選択すれば見ることができます。大抵の場合、この精密化によって格子定数が改善され、Pawley 法での精密化の初期値も大きく改善されます。

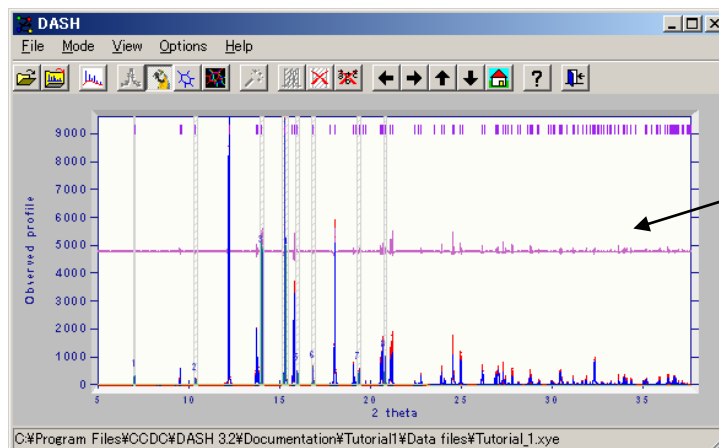
3) 8本のピークのフィッティングが終了すると、Pawley 法による精密化を行うのに十分な程度にピーク形状が定義されたものと判断し、*Pawley Refinement Step 2* ウィンドウが自動的にポップアップします。



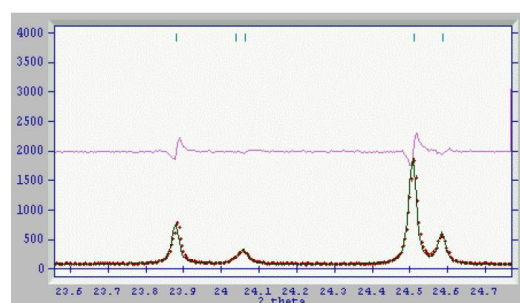
- 最初の Pawley 法による精密化では、すでに精密化された格子定数とゼロ点を用いて、バックグラウンドの項と個々の反射の強度に関する項のみを精密化します。
- Refine** を選択し、最小二乗法の計算を 3 サイクル実行します。結果として次のような(あるいは良好な、画面の数値と異なっています) $\chi$  (chi)の値が得られます。

135 reflections 8163 points  $R_{wp} = 23.08$   $R_{exp} = 9.10$   $\chi^2 = 6.441$

- Accept** をクリックしてこの精密化の結果を承認すると、フィッティングの結果が表示されます。
- メインウィンドウ内をクリックし、**Home** を押してデータのフィッティングの様子を見ます。



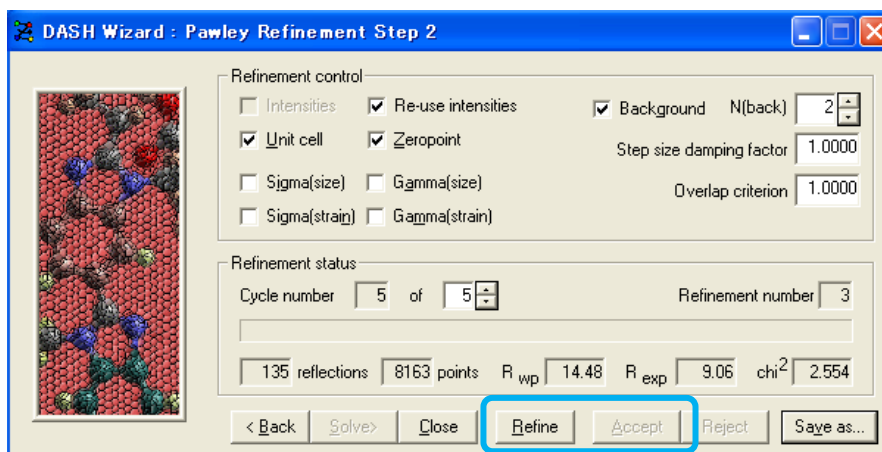
- (測定値 - 計算値)のプロットはピンク色で示し、計算値からのズレを表示しています。データを詳しく見ると[拡大すると]、次の図のような箇所が見つかるはずですが。





フィッティングは概ね良好ですが、フィットの悪さを示すわずかなサインカーブが存在することから、格子定数とゼロ点はなお精密化を必要とすることがわかります。

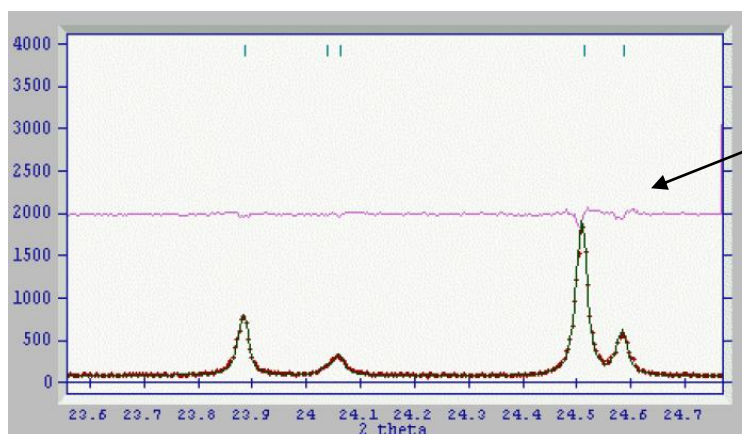
- Pawley ウィンドウに戻ると、プログラムが予め格子定数とゼロ点の精密化を実行するフラグ [チェックマーク]がついています。



- **Refine** を選択して Pawley 法による精密化を 5 サイクル実行します。これによってバックグラウンド、強度、格子定数、ゼロ点がすべて精密化します。フィッティングが改善され、たとえば次のようになります。

135 reflections 8163 points  $R_{wp} = 14.48$   $R_{exp} = 9.06$   $\chi^2 = 2.554$

- Figure of merit ( $R_{wp}$ ,  $\chi^2$ )が改善しているようでしたら、**Accept** を選択して、フィッティングがよくなっているか確認します。

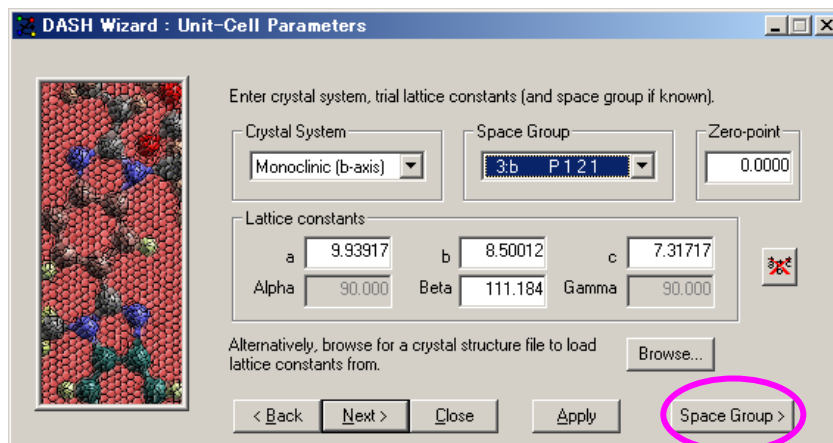


- プロファイル全体を検討します。 $\chi^2$  の値が 3 前後であれば、フィッティングは極めて良好と言えます。**Save as** をクリックして、精密化した結果を DASH の Pawley 法ファイル(.sdi) *Tutorial\_1.sdi* としてディスクに保存します。
- ここで DASH を終了して差し支えありません。**File** メニューで **Exit** を選択します。

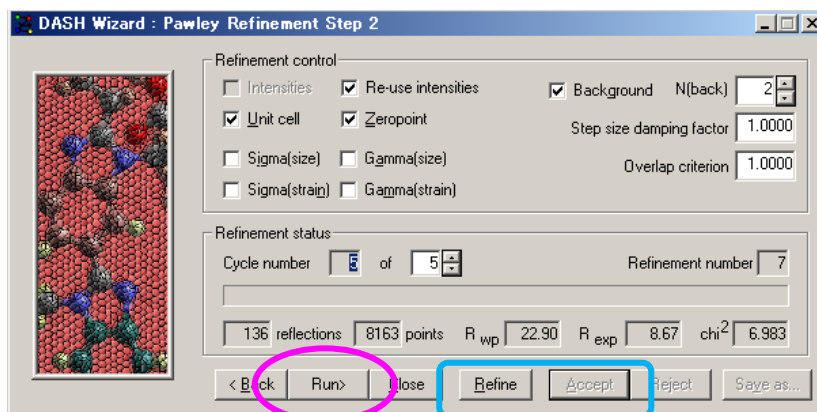
## ステージ 8： 空間群を決定する別の方法

空間群を決定する別の方法(手動でなく計算で空間分の候補を探す)を紹介します。(ステージ 6 の途中でステージ 8 へ来られた方は、このままステージ 8 の操作を行ってください。ステージ 7 まで終了された方は、ステージ 8 は、参考までにお読みください)

- *Unit Cell Parameters* ウィンドウで、右下の **Space Group >** を選択します。



- 必要な反射とその強度を空間群決定プログラムに与えるためには、試料の結晶系に属する最も対称性の低い空間群(この場合は  $P2$ )において Pawley 法によるフィッティングを行う必要があります。DASH は **Space Group >** を押すと、自動的に候補の空間群を選択します。
- *Pawley Refinement Step 1: Peak Picking* ウィンドウで **Clear Peaks** を選択し、**ステージ 7** の記載に従い Pawley 法によるフィッティングをやりなおします(Clear peaks で選択を解除し、独立したピークを 8 本拾い、精密化を行います)。良好な Pawley 法のフィッティングが得られたら(Refine ⇔ Accept を繰り返し、 $\chi^2$  の値を小さくする)、**Run >** を押して空間群決定プログラムを起動します。



- 計算が終了すると自動的に *Extinction Symbol* ウィンドウが開きます. このデータに対して最も確からしい空間群は  $P2_1$  で, 一番高い log-probability score となって先頭に表示されています.

```

C:\Program Files\CGDC\DASH 3.2\Documentation\Tutorial\1\Data files\table.asc
File Edit Search

When reading the table below keep in mind that more than one space group may
have the same Extinction Symbol. For more info about this see the International
Tables for Crystallography Vol A. For further info about how to interpret this file
visit: www.markvardsen.net/projects/ExtSym/explain-output.html

The extinction symbols are ranked in order of probability with the most probable
symbol being listed first

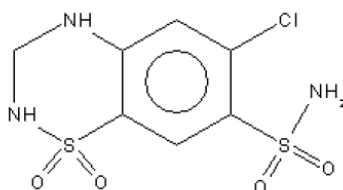
Extinction Symbol      log-probability score
P 1 21 1                7.4755 ←
P 1 - 1                  0
P 1 21/n 1             -221.228
P 1 n 1                 -228.703
P 1 21/a 1             -256.665
P 1 a 1                 -264.14
P 1 21/c 1             -284.602
P 1 c 1                 -292.078
C 1 - 1                 -1791.11
I 1 - 1                 -1989.99
C 1 c 1                 -2149.78
A 1 - 1                 -2295.43
A 1 n 1                 -2394.05
I 1 a 1                 -2480.68

```

- 結果のウィンドウを閉じ, *Pawley Refinement Step 2* ウィンドウで **< Back** を押します. ダイアログボックスが開き, 空間群決定の作業中に作成されたファイルを消去するかどうかを尋ねられるので, **Yes** (日本語 OS の場合, はい) を選択します. *Space Group* プルダウンメニューから最も確からしいと決定された空間群 ( $P2_1$ ) を選択し, **Apply** を押します. 前と同じく目盛マーク (Bragg 反射位置) とピーク位置との対応を確認してください.
- 正しい空間群を選択したので, この空間群で *Pawley* 法による精密化を実行することになります. **ステージ 7** に進んでください (*Pawley Refinement Step 1* で 8 本のピークを拾ったところに合流します).

## ステージ 9: 分子構造モデルの組み立て

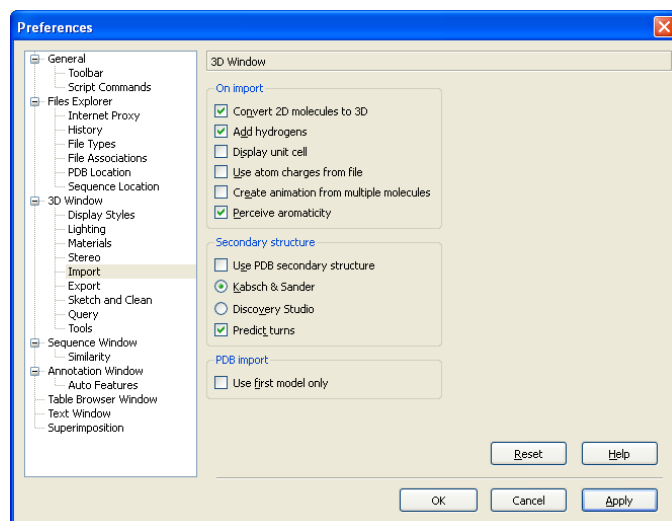
解析しようとする分子の 2D 分子構造を次に示します.



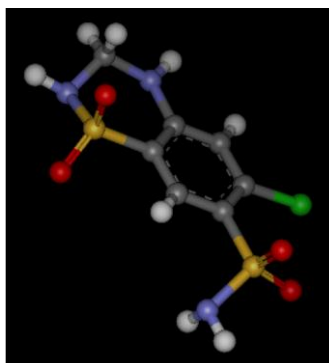
- 実空間法で結晶構造解析を行う場合, 用いる 3D 分子構造は, 内部座標系の *zmatrix* が好都合です. 任意の分子モデリングソフトでこの分子の 3D 構造を作成し, 結果を *zmatrix* あるいは, *pdb*, *mol*, *mol2* のいずれかの形式で保存します. *DASH* は, これらの形式のファイルを自動で *zmatrix* に変換することができます. (多形の結晶構造がわかっている場合には,

cifファイルを読み込めますので、その分子構造を利用することも可能です)

- 手元に分子モデルソフトウェアが無い場合には、このチュートリアルに付属のモデルファイル *Tutorial\_1.mol2* を使います。この分子の座標は Cambridge Structural Database 参照コード HCSBTZ から取っています。自分でモデルを作らずこのモデルを利用するときは、**ステージ 10** へ進んでください。
- このチュートリアルでは、Accelrys Jdraw(旧 ISIS/Draw)などの作図プログラムで分子のスケッチを描いたものと仮定します。[ここでは、ISIS/Draw と次に述べるDS Visualizer を使用していますが、2D 作図には ChemDraw, ChemSketch や 3D 化には Chem3D, MOPAC, Spartan といったソフトを用いることも可能です]
- さらに、2D から 3D への変換は広く使用されている DS Visualizer で行うものとします。
- 分子を ISIS/Draw で作図したときは、分子全体を選択して **Ctrl + C** でクリップボードにコピーします。
- DS Visualizer では、次に示す **3D Window Import** のオプション (**Edit > Preferences...**メニューからアクセスします) が有効になっていることを確認してください。



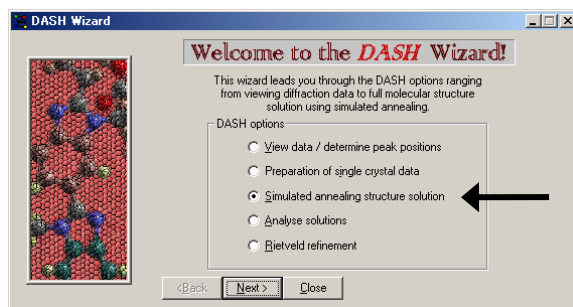
- **Ctrl + V** を用いて二次元モデルを DS Visualizer に貼り付けます。
- 分子を DS Visualizer に貼り付けると、2D 構造が次のように三次元モデルに変換されます (ボール&スティック形式で表示した場合)。




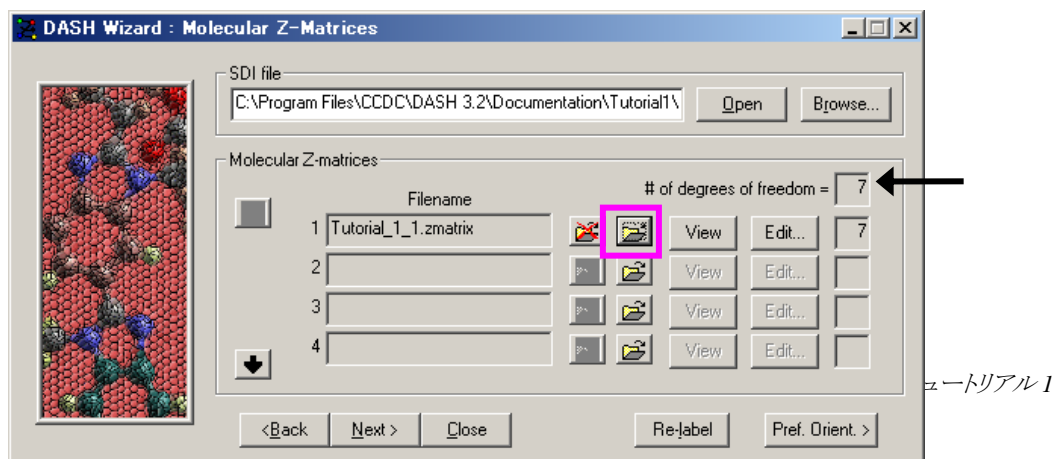
- 分子座標を mol 形式で *Tutorial\_1.mol* として保存します。


### ステージ 10： 構造決定の準備

- 前と同様に DASH を起動し、ウィザードから **Simulated annealing structure solution** を選択します。



- Next >** をクリックします。
- Browse...** をクリックし、**ステージ 7** の終わりで保存した DASH プロジェクトファイル (*Tutorial\_1.sdi*)を探して読み込みます。
- 次に、アイコン  をクリックし、分子ファイルの *Tutorial\_1.mol* [ステージ 9 で作成]または *Tutorial\_1.mol2* [Tutorial に付属]ファイルを読み込みます。
- DASH は、分子の立体配座の記述に用いる内部座標形式のファイル (Z-matrix) を自動的に作成します。

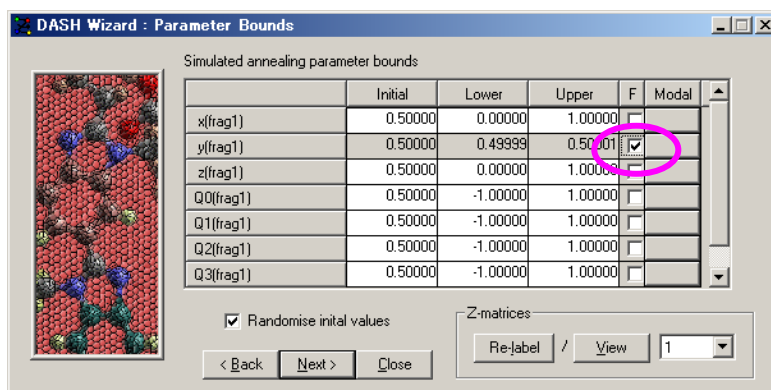


- DASHは分子を解析して回転可能なねじれ角を自動的に選択します。今回の分子の場合、回転可能なねじれ角はベンゼン環とSO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>基の間の結合だけです。
- *Molecular Z-Matrices* ウィンドウでアイコン  をクリックし、ファイル *Tutorial\_1.mol* を読み込むと、新たに内部座標系のファイルが作成され、*Tutorial\_1.zmatrix* として読み込まれます。
- DASH は、結晶構造を決定するためには7つの自由度(分子の重心の座標 3, 単位格子内の分子の配向を記述するパラメータ 3, 分子のコンホメーションを記述するのに必要な分子内部ねじれ角 1)を決定する必要があると判定しています。[右端の「# of degrees of freedom」参照]
- 以上で分子に関して DASH が必要とする情報が揃ったので **Next >** をクリックします。

次のメニューでは、パラメータの値を固定または制限することができます。この例では、P2<sub>1</sub> が極性を持つ空間群であるため、分子の重心の y 座標を任意の位置に固定することができます。

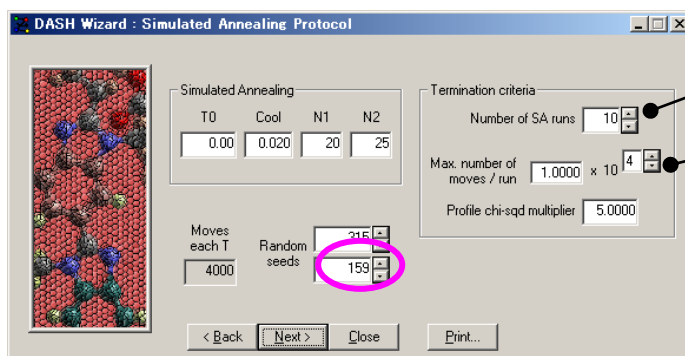
(注意:軸を固定してよいかどうかは、空間群によります。不明な場合は、固定しないでください)

- このためには分子フラグメントの y 座標(y(*frag1*))の行の **F** (fix の略)のチェックボックスをクリックします。



- **Next >** をクリックします。

ここで開く *Simulated Annealing Protocol* ウィンドウはここでは無視します。大抵の場合はデフォルトの値で十分です。詳細については *DASH User Guide* を参照してください。 **Next >** をクリックします。



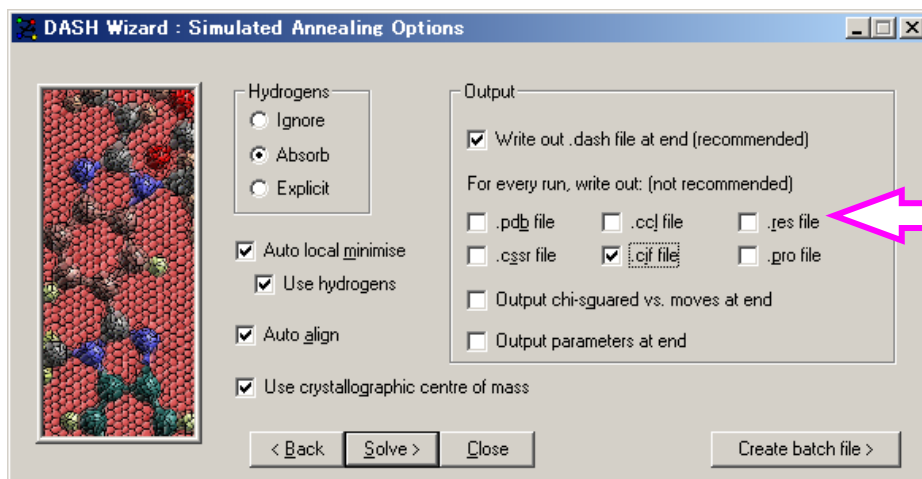
いくつ解を出すか

1 run 内で何回転動かすか。  
Parameter 多ければ増やしても可

DASH チュートリアル 1

次に表示される *Simulated Annealing Options* ウィンドウでは、シミュレーテッドアニーリング計算(SA)の option を設定することができます。

以下、簡単に紹介いたします。



- **Hydrogens:** 水素は散乱能が低いので省略するのであれば、**Ignore** を選択すると、計算時間が短時間で済みます。**Absorb** を選択すると、水素から結合している原子へ電子を移動させます。単結晶のデータに対しては、SA (Simulated Annealing)において水素原子を計算に含めることができます(**Explicit**)。

注: デフォルト設定では、毎回の SA の最後の局所的最適化において水素を含めます。  
Rietveld 法による精密化では、常に水素を含めます。

- **Use crystallographic centre of mass:** これを選択すると、分子の回転中心を計算する際に各原子に  $Z^2$  ( $Z$  は電子の数) の重みを与えます。選択しなければ特に重みは与えません。
- **Auto local minimise:** これを選択すると、最終解を出力する前に、シンプレックス法アルゴリズムにより、 $\chi^2$  を最小化するように局所的最適化計算を実行します。**Auto local minimise** の下の **Use hydrogens** を選択すると、最終解の局所的最適化に水素を含めます。
- **Auto align:** 2 回以上の SA 計算を実行した時だけ、最終解の書き出し前に、後で構造を比較しやすいように原子の座標を標準的な位置にそろえます。
- **Output .dash:** すべての解の結晶構造と回折パターン、Pawley fit をバイナリーファイルとして、.dash で書き出します。再びこのファイルを読み込むことで、DASH を終了させた後からでも解析結果を呼び出せます。
- **Output .pdb:** 最終解の結晶構造を pdb 形式で書き出します。
- **Output .cssr:** 最終解の結晶構造を cssr 形式で書き出します。
- **Output .ccl:** 最終解の結晶構造を ccl 形式で書き出します。
- **Output .pro:**  $2\theta$ , 測定回折パターン、最良解から計算された回折パターン、元の esd を含む .pro ファイルを書き出します。このファイルは ASCII 形式で、Excel などの表計算ソフト

にインポートすることができます。

- **Output .cif:** 最終解の結晶構造を cif 形式で書き出します。
- **Output .res:** 最終解の結晶構造を res 形式で書き出します。
- **Output chi-squared vs. moves:** SA 完了後に、プロファイルの $\chi^2$ とパラメータの移動回数のグラフを ASCII 形式のファイルに書き出し、拡張子.chi をつけます。このファイルは Excel などの表計算ソフトにインポートできます。

SA を 2 回以上実行するように指定すると、上のオプションも毎回適用され、多数のファイルが作成されることがあります。Use hydrogens 以外のオプションはいずれも、SA の実行中に有効・無効を切り替えることができます。

- **Solve >** をクリックします。
- SA 計算が開始されます。

## ステージ 11： 構造決定計算の追跡

結晶構造決定計算の出力についての詳細は、DASH User Guide を参照してください。このチュートリアルでは次の 2 つに注目するだけで十分です。

- プロファイルの $\chi^2$  (Profile  $\chi^2$ )
- (実測値 - 計算値)のプロット、すなわちデフォルトではピンク色で表示する回折パターン

プロファイルの $\chi^2$ は、**ステージ 7**で Pawley 法によるフィッティングを行った際に得られたプロファイル $\chi^2$ と同じスケールなので、現在の $\chi^2$ が Pawley 法のプロファイル $\chi^2$ に近ければ、構造決定に成功したと考えられます。

SA 計算は SA 出力画面にある次のボタンのいずれかを押すまで続きます。

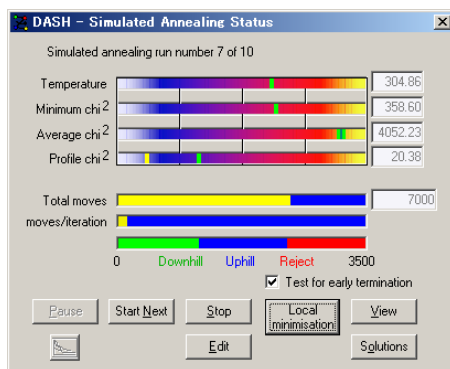
- **Pause** - SA を中断し、**OK** を押すと再開します。DASH はコンピュータへの計算負荷が重い場合、CPU を一時的に開放したいときに便利です。
- **Start next** - 複数回の SA 計算を実行しているとき、**Start next** ボタンを押すと現在の計算を中止し、次を開始します。
- **Stop**- SA 計算をただちに中止し最初の *Simulated Annealing Protocol* ウィンドウに戻ります。
- SA 計算を中断してパラメータを変更するには **Edit** をクリックします。
- **Local minimisation** - シンプレックス法による局所的最適化計算を行い、現在の最良の構造の近傍で構造を精密化します。



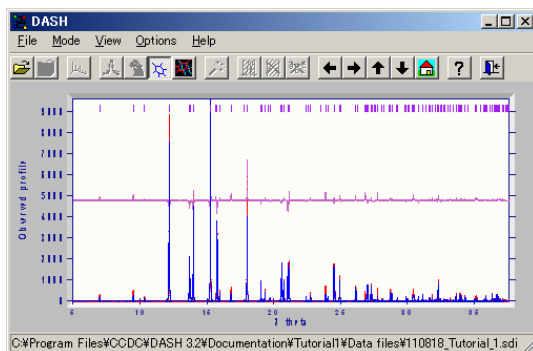
- **View** をクリックすると、現在の計算における最良の解を表示します。
- これまでに得た解を解析するには **Solutions** をクリックします。

中程度の規格のパソコン(たとえば Pentium III, 300 MHz)で構造解析を行った場合、30 秒以内にプロファイルの $\chi^2$ が約 12 に達します。このとき構造は十分な精度で決定されています(これは理想的な場合であり、実際の値はこれと異なることもあります)。

ここではプロファイルの $\chi^2$ が 8.50 で、Pawley 法で得られたプロファイルの $\chi^2$ の 4 倍より小さくなっており、解析は終了しています。(下記は計算途中の例)



差のプロットは次の図のようになります。



- 高角に至るまで、フィッティングは極めて良好に行われています。
- 実質的にはスケール因子の精密化を行っただけですが、結晶構造がきちんと解かれていることが明確にわかります。
- 三次元表示で結果を見るには、**Analyse Solutions** の **View** ボタンをクリックします。

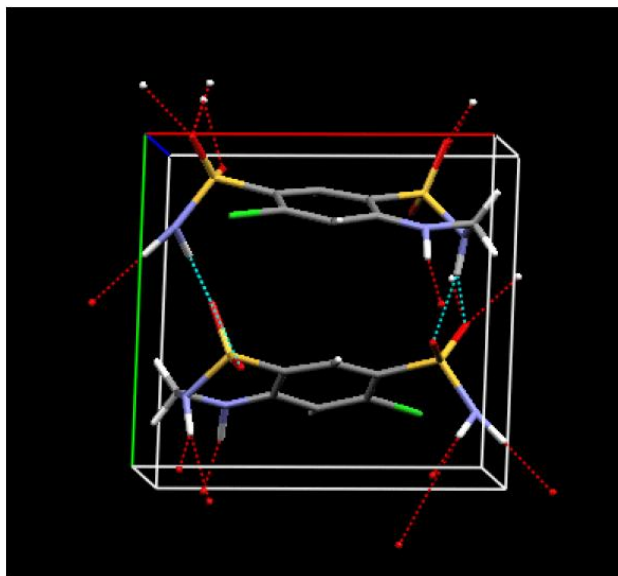
Run	View	Overlay	Prof. Chi-sqd	Int. Chi-sqd	Restart	Rietveld
1	5	<input checked="" type="checkbox"/>	8.50	90.64		
2	8	<input checked="" type="checkbox"/>	8.50	90.64		
3	2	<input checked="" type="checkbox"/>	8.50	90.64		
4	7	<input checked="" type="checkbox"/>	8.50	90.64		
5	4	<input checked="" type="checkbox"/>	8.50	90.65		

## ステージ 12： 出力された構造の検討

DASH では, SA 計算の最終結果を 5 種類の形式の座標ファイルで出力することができます。Save... のボタンを押し, *Save Solutions* の中から, 必要なフォーマットを選択してください。( *Simulated Annealing Options* ウィンドウで *Output* を指定していた場合, 自動的に各解が保存されています)。プロジェクトのファイル名を *Tutorial\_1.sdi* として説明します。

- *Tutorial\_1.pdb*: Protein Data Bank 形式, SA の解の直交座標を含む
- *Tutorial\_1.cssr*: Cambridge Structure Search と Retrieval 形式, SA の解の部分座標を含む
- *Tutorial\_1.ccl*: Cambridge Crystallographic Subroutine Library 形式, SA の解の部分座標を含む
- *Tutorial\_1.cif*: Crystal Information File 形式, SA の解の部分座標を含む
- *Tutorial\_1.res*: SHELX 形式, SA の解の部分座標を含む

**Analyse Solutions** の **View** ボタンを押すと, DASH と同梱の表示ソフト Mercury が立ちあがります。表示オプションとして **Packing** (パッキング) と **H-Bonds** (水素結合) があります。これらを用いて表示させると下図のようになります。すべての水素結合ドナーとアクセプターは水素結合を形成していることがわかります。



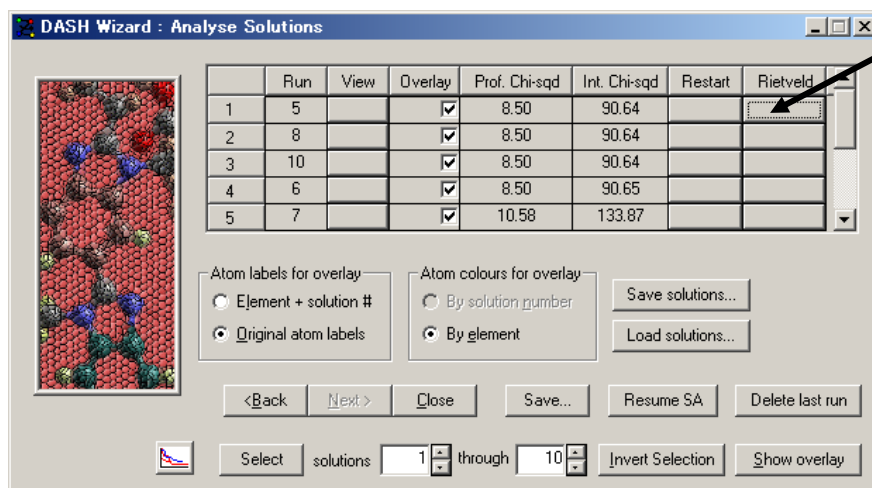
**b** 軸方向の分子の正確な位置は分子を固定した点によって異なります。上図は分子を  $y = 0.5$  に固定した場合です。この解は, Dupont & Dideberg (1972) により室温で解析された

hydrochlorothiazide の構造と極めてよく一致しています。

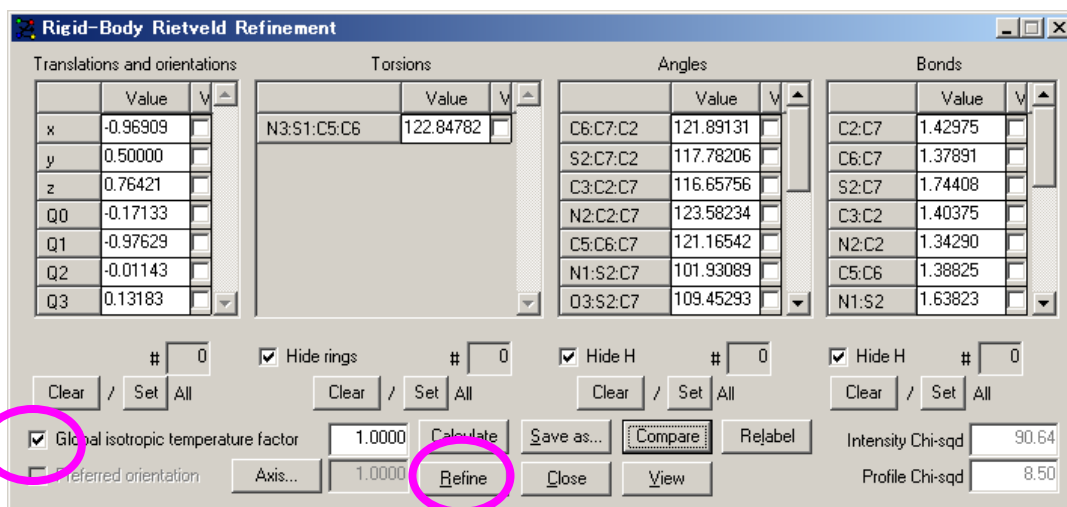
### ステージ 13： Rietveld 法による精密化

- DASH には、内部プログラムを使用する以外にも、外部プログラムを利用することも含め、Rietveld 法精密化のオプションがいくつかあります。ここでは、物理的に意味のある構造精密化を行うため、内蔵させている分子を剛体として計算する Rietveld 法精密化モジュールを使用します (DASH User Guide の 12.1 項 Rigid-body Rietveld refinement を参照)。このモジュールは Pawley 法による精密化で得られた回折強度と相関行列を用いるので、**ステージ 1** で選択した  $2\theta$  の分解能の範囲に限られます。これまでの作業では DASH のデフォルト設定により、 $2\theta = 37.65^\circ$  までのデータを用いており、対応する分解能は  $1.75 \text{ \AA}$  です。
- **ステージ 7** で行った Pawley 法による精密化の結果から、抽出した回折強度の数、たとえば 135 が確認できます。Pawley 法の結果を見るには DASH ウィンドウの **View** メニューで **Pawley / SA** を選択します。データの分解能が低いため、この分子の座標を無条件に精密化して物理的に妥当な値を得ることは期待できません。そのような精密化に必要な情報が、ここには含まれていないことに注意してください。
- しかし分子を、**Z-matrix** で表した剛体の部分構造がつながったものとしてフィッティングを行うことには意味があります。**Z-matrix** には、**atom-by-atom** でどのように原子を使って分子を組み立てていくかが書かれています。ある原子からスタートし、隣の原子との結合の長さ [2 原子間]、その次の原子に対する結合角 [3 原子間]、そのまた先の原子に対するねじれ角 [4 原子間] を指定といったような分子の設計図が情報として含まれています。
- **ステージ 10** では、**ステージ 9** の直交座標系を **Z-matrix** に変換する計算を実行しました。さらに原子の種類から、この分子では変数として扱えるねじれ角は N3:S1:C5:C6 のみであることをプログラムが判定しています。SA 計算では、**Z-matrix** の他のパラメータをすべて固定してパラメータ空間を探索し、すでに見たように化学的に意味のある結果を得ています。*Analyse Solutions* ダイアログボックス内の **Rietveld** ボタンを用いて、選択した解に対して **Z-matrix** の任意のパラメータを変化させることができます。
- Rietveld 法による精密化の最初のステップでは、全体的な等方性温度因子スケール以外のパラメータをすべて固定します。これによって **Z-matrix** 内の各原子について **Biso** の値を決め、それを全体のスケール因子で調節することが可能になります。DASH でのデフォルト値は、すべての非水素原子に対して **Biso** = 3.0、水素原子に対して **Biso** = 6.0 です。スケール因子を **K** とし、**K** を精密化した後の **Z-matrix** ファイルへの入力値は **K.Biso** となります。
- 単結晶 X 線回折の精密化では、水素の **Biso** の値を、結合している重原子の 1.25 倍程度にとるのが普通です。粉末回折の場合、これくらいの大きさをもった分子に対しては、すべ

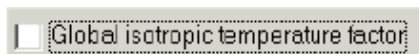
ての水素原子に同一の値を指定しても目に見える効果はほとんどありません。水素の Biso の初期値である 6.0 はおそらく過大で、4.0 程度に修正することが考えられます。しかし非水素原子の Biso 値はこの大きさの分子における室温での値として典型的なものです。



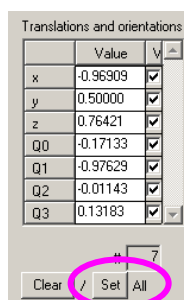
- *Analyse Solutions* ダイアログボックスにおける一番上にある解の **Rietveld** と書かれた列のボタンを押し、どのプログラムを使って精密化を行うか選択し(ここでは *Rigid-body Rietveld refinement* を選択), **Next>** をクリックします。



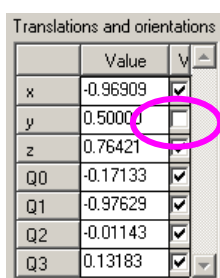
- **Global isotropic temperature factor** チェックボックス[左下]が選択されていることを確認し, **Refine** をクリックします。その初期値 1.000, Chi-sqd の初期値 90.64, Profile Chi-sqd の初期値 8.50 がそれぞれ 0.22125, 47.11, 6.48 に変化します。温度因子スケールがこのように小さいことは、データ測定温度が 20 K と低いことに対応しています。チェックボックスの選択を解除して、この温度因子を固定します。



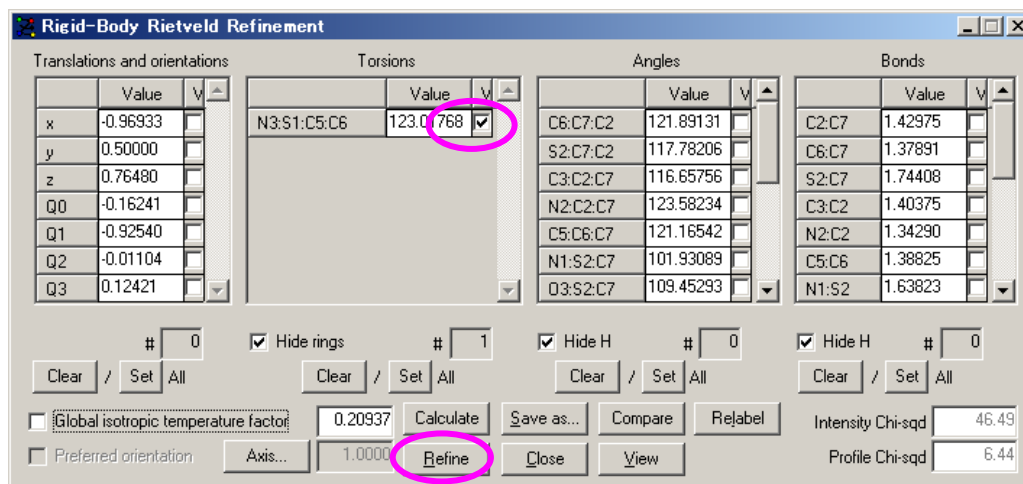
- 次に左側にある *Translations and orientations* の下にある **Set** ボタンをクリックして、この表の V で示されたチェックボックスをオンにします。



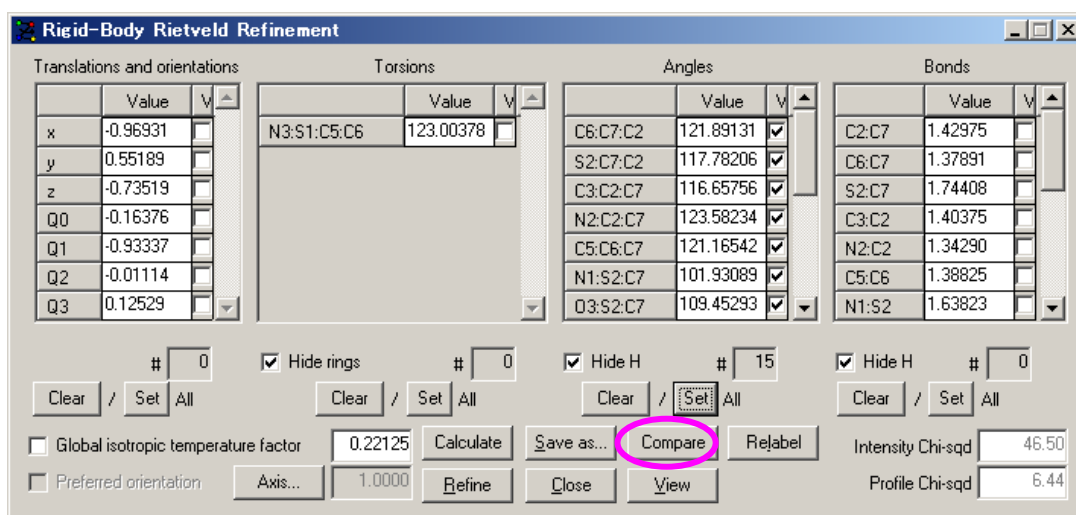
- これによって分子の並進パラメータおよび分子の向きに関するパラメータの精密化が指定されます。この空間群  $P2_1$  では y 軸方向の位置は任意なので、y のチェックボックスをオフにし、**Refine** をクリックします。(y 軸も動かすかどうかは、空間群によります)



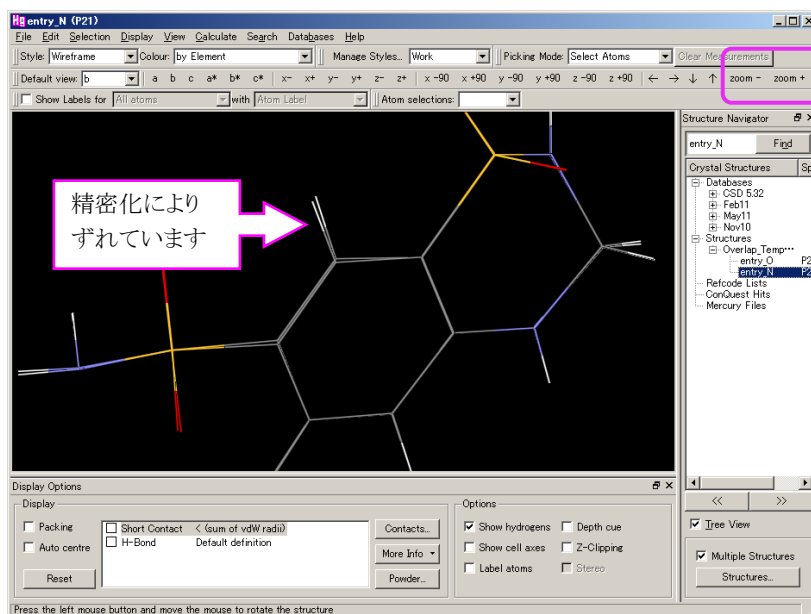
- Chi-sqd の値はそれぞれ 46.49, 6.44 に低下しています。
- この結果は、発表に適するように構造を精密化するのに使用するのに妥当と考えられます。この段階で CIF 形式のファイルを出力することができ、**Save as...** ボタンを用い、たとえば出力ファイル名を *Tut1-Rietveld-Biso* とし、ファイル形式のリストから *.cif* を選んで保存します。
- すべてのねじれ角を可変としても **Rietveld** 法による精密化は安定に計算できます。**Torsions** 欄下方の **Set** ボタンをクリックし、**Global isotropic temperature factor** のチェックを外し、**Translations and Orientations** については下の **Clear** ボタンでクリアします。



- **Refine** をクリックし、ねじれ角を精密化してもパラメータにはごく僅かな変化しか見られず、Chi-sqd の値はほとんど減少しないはずです。
- 追加の実験として、*Translations and Orientations* および *Torsions* を各々の **Clear** ボタンでオフにし、**Global isotropic temperature factor** ボックスの選択を外した状態ですべての結合角の精密化を行うこともできます。*Angles* のところだけにチェックを入れ、結合のみ可変とします。



- **Refine** をクリックし、結合角を精密化すると、座標が変化し、Chi-sqd の値は減少して 41.06 および 6.17 となります。**Compare** をクリックすると、Rietveld 法により精密化された構造と精密化を行う前の構造とを比較することができます。Mercury で表示すると、座標がごく僅かしか変化していないことがわかります。(わかりにくい場合は、**Zoom-in** 機能を利用してください[Mercury の zoom + をクリック])



- 最終的にここで得られた構造は、先ほど保存した CIF ファイルの構造より優れているということはありませんが、精密化の結果が安定であり、Chi-sqd 曲面の極小点に達していることがわかります。
- 同様にしてすべての結合長を精密化することもでき、Chi-sqd 値が僅かに減少しますが、この解については座標が改善されたとは解釈できません。精密化による結合長および結合角の変化が妥当なものであると判断するだけのデータがないからです。別の見方をすると、わずかに異なった分子モデルから同じような小さい Chi-sqd が得られるともいえます。この時点では座標の標準偏差に関する情報は得られていません。

**註:** 試しに、共通等方性温度因子 (**global isotropic temperature factor**) を多数のねじれ角、結合角または原子間距離と同時に精密化すると、収束時間がかなり長くなります (2~3 分)。このことは温度因子と他のパラメータが強く相関していることを示します。

- メニューボックスで任意のパラメータの値を手動で設定して **Calculate** をクリックすると、個々のパラメータが Chi-sqd の計算値に及ぼす影響を知ることができます。この **Calculate** は、単にそのときの Chi-sqd を計算しているだけです。たとえば C2:C7 結合の長さを 1.42975 から 1.43975 に変更すると、Chi-sqd はそれぞれわずかに増加します。より重い原子、たとえば Cl1:C4 の塩素原子を動かして、結合長を 0.01 だけ変化させたときの Chi-sqd の変化は、より大きくなります。

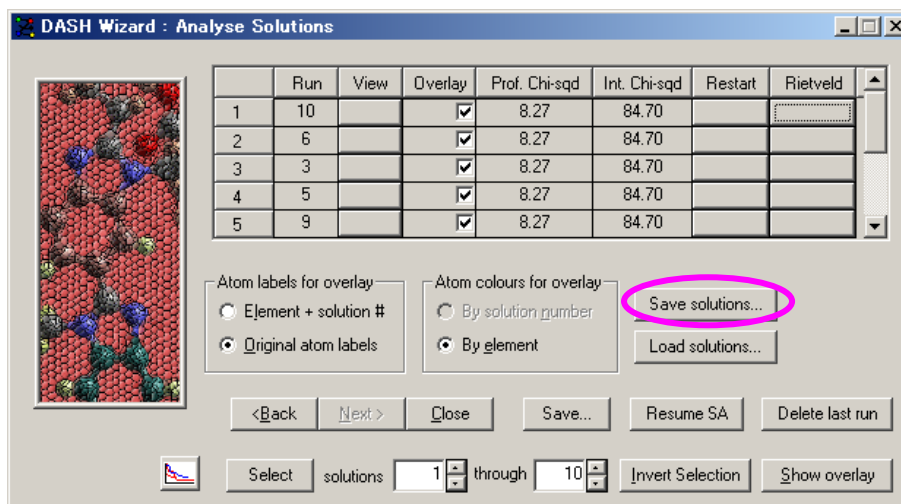
### 最高分解能の利用

完全に構造未知の試料であれば、DASH で Pawley 法による回折強度の抽出ができる範囲内の最高分解能で精密化を行うといいでしょう。このチュートリアルでは、これまで抽出した回折強度 135 点、分解能 1.75Å で作業してきましたが、2011 年夏現在、DASH(version 3.2)では最大 600 点の回折強度を使うことができます。このためには、**ステージ 1** に戻ってデータ読み込みの時に  $2\theta$  の打ち切りの値を増加させます。たとえば  $2\theta = 44.0^\circ$  までを取れば、対応する分解能は 1.507 Å となります。このとき Pawley 法によるフィッティングでは、204 点の強度抽出に対して Chi-sqd が約 2.35 となり、SA を実行すると Chi-sqd の典型的な値は約 7.04 となります。Rietveld 法による精密化を (a) 全体的温度因子、(b) 並進・回転の順で行うと、温度因子は 0.211、Chi-sqd は 28.42、プロファイルの Chi-sqd は 4.01 となります。

### 他の SA の解を最適化するには

**Close** で Rietveld ウィンドウを閉じ、DASH ウィンドウに戻ります。**Mode** プルダウンメニューをクリックし、**Analyse Solutions** を選択して、計算した SA の解をリスト表示します。精密化を行いたい解を選択し、計算を行います。それぞれの計算結果については、**Save** のボタンをクリックすると保存できます。

SA の結果は, Save Solutions のボタンをクリックすると.dash というファイルに保存されます。Analyse Solutions ウィンドウで Load Solutions のボタンをクリックすると再度呼び出すことが可能です。



## 参考文献

DICVOL プログラム:

*D. Louer & M. Louer (1972) J. Appl. Crystallogr. 5, 271-275.*

*A. Boultif & D. Louer (1991) J. Appl. Crystallogr. 24, 987-993.*

消滅則シンボルプログラム(空間群の判定):

*Markvardsen, A.J., David, W.I.F., Johnson, J.C., Shankland, K. (2001) Acta Cryst., A57, 47-54*

モデル構築ソフト:

*DS Visualizer Version 2.0. Copyright 2007 Accelrys Software, Inc.*

単結晶の構造(CSD 参照コード HCSBTZ):

*L. Dupont & O. Dideberg (1972) Acta Crystallogr. B28, 2340-2347.*

お疲れ様でした。チュートリアル 1 は、ここで終了です。