3-イソシアノテオネリンをリード化合物とした 付着阻害活性に関する構造–活性相関の考察と 新規付着阻害物質の創製

北野 克和

東京農工大学大学院農学研究院応用生命化学部門 〒183–8509 東京都府中市幸町3丁目5番地の8

Development of new antifouling active isocyano compounds: Structure–antifouling activity relationship studies using 3-isocyanotheonellin as lead compound

Yoshikazu Kitano

Tokyo University of Agriculture and Technology, 3–5–8 Saiwai-cho, Fuchu-shi, Tokyo 183–8509, Japan

* Corresponding author: Yoshikazu Kitano E-mail: kitayo@cc.tuat.ac.jp

(Received February 24, 2018; Accepted April 24, 2018; Published Online June 24, 2018)

Abstract

During the Fusetani Biofouling Project, isolation of natural products from benthic organisms was carried out in an attempt to develop nontoxic antifouling agents. In fact, more than 50 compounds showing antifouling activity against barnacle larvae have been obtained from marine invertebrates. 3-Isocyanotheonellin, isolated from a nudibranch species, exhibits potent antifouling activity against the larvae of the barnacle *Balanus amphitrite* (EC_{50} 0.13 μ g/mL). However, its toxicity at high concentrations and structure–antifouling activity relationship have not yet been demonstrated. Herein, the structure–antifouling activity relationship studies conducted by synthesizing 3-isocyanotheonellin and its analogues are described. Based on these studies, various antifouling active isocyano compounds have been designed for developing environmentally friendly antifouling agents. In this review, the antifouling activity of isocyanides derived from citronellol and amino acids is mainly described. Most of these compounds showed potent antifouling activity without any significant toxicity against the cyprid larvae of the barnacle. These results suggested that isocyano compounds could be developed as environmentally friendly antifoulants in the near future. In addition, attempts to elucidate the mechanism underlying the expression of antifouling activity for the isocyano compounds are described.

Keywords: anti-fouling activity, barnacle, isocyanide, structure–activity relationship

緒言

フジツボ、イガイ、ヒドロ虫などの海洋付着生物は、船底、漁網（養殖網・定置網）、および発電所の取水路等に付着し、多大な被害を与えていて、その被害額は日本だけでも年間1,000億円程度といわれている（内藤・藤木, 2004）。これら付着生物の防除には、古くより有機金属化合物などが用いられ、特に1960年代からはTBTOなどの有機スズ系防汚塗料が優れた効果を発揮することから主に使われてきた。しかしながら、その後有機スズ系防汚塗料は、様々な環境汚染が明らかになり、1990年代には、新たなコンセプトに基づく“環境にやさしい”付着防汚剤の開発が強く望まれていた（有機スズ系防汚塗料は、国際海事機関（IMO）により2008年9月から世界的に全面的な使用の規制に至っている）。そのような背景から、伏谷着生機構プロジェクトにおいて、天然物由来の付着阻害活性物質の探索が行われた。

これは、海洋底棲生物である、ウミウシやカイメンの体表面には付着生物の付着が見られないことから、これら生物が低毒性の付着阻害活性物質を有していることを予想して行われたものである。実際に、ウミウシやカイメンなどの海洋生物から、フジツボキブリス幼生の付着を強力に阻害し、かつ、毒性がきわめて弱い新規の低分子化合物が50種以上、単離・構造決定された（Fusetani, 2004; Fusetani et al., 1996; Hirota et al., 1996, 1998; Okino et al., 1995, 1996a, b）。中でも、3-イソシアノテオネリン（1）をはじめとする海洋天然物特有のイソシアノ基（–NC）を有するテルペン類が多く見いだされた（図1）。しかしながら、これらテルペン類の高濃度における毒性や、イソシアノ基の必要性については十分な検証は行われていなかった。そこで筆者らは、伏谷プロジェクトの後継として、付着阻害活性を有する天然物の合成経路を確立し、高濃度におけるキブリス幼生の付着試験を実施する

図1. 伏谷プロジェクトで単離されたイソニトリル化合物の構造とフジツボキプリス幼生に対する付着阻害活性値

図2. シクロヘキサン骨格を有する化合物の付着阻害活性値

とともに、類縁体を合成してイソシアノ基の必要性を含めた構造-活性相関の考察を行った。さらには、得られた情報を基に、様々なイソシアノ基を含む付着阻害活性化合物を創製し、“環境にやさしい”付着防汚剤開発を目指した。本総説では、筆者らのこれまでの研究を中心とした、イソニトリル化合物の付着阻害活性とその発現メカニズムの解明に関する考察について述べる。

1. 3-イソシアノテオネリン (1) の全合成と類縁化合物合成による付着阻害活性に関する構造-活性相関の考察と、イソニトリル系付着阻害物質の創製

まず初めに、3-イソシアノテオネリン (1) の全合成が行われた。全合成は、市販の化合物より7段階、全体収率約5%で達成されるとともに、1の立体異性体、および幾何異性体が同時に合成された (Kitano et al., 2002)。ここで、一般的な天然物の全合成の点から考えると、工程数7段階、全体収率5%というのはそれほど悪い数値ではない。しかしながら、現在の付着防汚剤の価格、および使用量から考えると、とてもではないが、この化学合成をそのまま実用化することは現実的ではない。そのため、類似体の活性を確認しながら進めていく構造-活性相関の考察は非常に意味のある手法である。合成した1および異性体について、タテジマフジツボ (*Balanus amphitrite*) キプリス幼生の付着試験を行った結果、いずれの化合物も有効な付着阻害活性 (EC₅₀値: 0.18–0.41 µg/mL) を示すとともに、高濃度 (30 µg/mL) においてもキプリス幼生に対する顕著な毒性は観察され

なかった (LC₅₀>30 µg/mL)。ここで、付着試験の陽性対照化合物としては、過去に付着防汚剤として利用されていた硫酸銅を使用した。硫酸銅はEC₅₀値が0.27 µg/mLであり、十分な付着阻害活性を有しているが、LC₅₀値は2.95 µg/mLであり低濃度 (1.0 µg/mL) においても徐々にキプリス幼生の死亡率が上昇することが確認された。これは、硫酸銅がキプリス幼生を殺生する、すなわち毒性によって付着阻害活性を発現することを示唆している。それに対して、1およびその類縁体は、高濃度でもキプリス幼生を殺生することなく付着のみを阻害していることから、忌避的に付着を阻害していて、明らかに硫酸銅とは異なり低毒性であることが示された結果となっている。この結果を基に、様々なイソシアノシクロヘキサン部分を有する化合物を合成し、付着阻害活性について確認するとともに、構造-活性相関について考察した (図2) (Kitano et al., 2003, 2004)。その結果、様々な化合物で有効な付着阻害活性が観察されたが、特に1のジエン部分をエステルに変換したような化合物2および3においては、1と同様に高濃度においても顕著な毒性を発現することなく、さらには1よりも高い付着阻害活性が観察された。一方、化合物3からイソシアノ基を欠いた化合物4においては、有効な付着阻害活性が確認されなかった。以上の結果より、イソシアノ基が付着阻害活性発現に重要であることが示唆された。ここで、化合物2および3の合成経路について考えた場合、天然物1よりは容易に効率よく合成できるが、シクロヘキサン骨格を有していることから、常に立体異性体が副生成物として得ら

図3. 直鎖アルキルイソニトリル化合物の付着阻害活性値

図4. β-シトロネロールからイソニトリル化合物9-22の合成経路

れてしまう点があげられる。そこで、単純なアルキル鎖にイソシアノ基が結合した化合物を合成し、付着試験を行った (Nogata et al., 2004)。その結果、多くの化合物において、天然物 **1** と同様に高濃度においても毒性を発現することなく、有効な付着阻害活性が観察された。特に、化合物 **5** および **6** のような化合物においては、**1** よりも高い付着阻害活性が観察された (図3)。化合物 **5** については、市販の化合物 (10-ウンデセン酸メチル) より2段階ではほぼ定量的に合成でき、天然物 **1** に比べて非常に効率よく合成できる化合物である。なお、本項については、すでに成書にもまとめられているのでそちらも参考にさせていただきたい (北野・野方, 2006; Nogata and Kitano, 2006)。

2. β-シトロネロール誘導体イソニトリル化合物の合成と付着阻害活性 (Kitano et al., 2011)

前項で述べたように、単純なアルキル鎖を有する化合物においても、イソシアノ基を導入すれば、フジツボ類に対する有効な付着阻害活性が観察される結果が得られていた。ただし、イソシアノ基が結合している炭素には水素が結合していない、すなわち、第三級アルキルイソシアノ基が望ましいということも示唆されていた。ここで、これまでに合成されたイソニトリル化合物において、第三級アルキルイソシアノ基がどのように合成されたかを述べると、カルボニル基に対して、グリニャール試薬等を作用させ、第三級アルコールを得た後に、イソシアノ基に変換する方法が行われていた。しかしながら、この方法は、化合物合成の効率を考えるとあまり望ましいものではなかった。そこで、β-シトロネロール (7) の構造に着目した。β-シトロネロール (7) は、簡単に第三級アルコール化合物であるヒドロキシシトロネロール (8) へと変換が可能な化合物である。そして、この第三級アルコール部分をイソシアノ基に変換できるとともに、第一級アルコール部分は種々の官能基の導入が可能であり、様々なイソニトリル化合物を容易に合成できることが期待された (図4)。合成された化合物の構造とタゲマフジツボキプリス幼生に対する付着阻害活性 (EC₅₀)、死亡率 (LC₅₀)、および安全域 (LC₅₀/EC₅₀) について表1に示す。表1に示されているように、図4のR部分にヒドロキシ基、エステル、ハロゲン、エーテ

 表1. β-シトロネロール誘導体イソニトリル化合物の構造とタゲマフジツボキプリス幼生に対する EC₅₀、LC₅₀、および LC₅₀/EC₅₀ 値

化合物番号	R	EC ₅₀ (µg/mL)	LC ₅₀ (µg/mL)	LC ₅₀ /EC ₅₀
9	OH	0.22	>100	>454
10		0.38	>100	>263
11		0.08	>100	>1250
12		0.33	>100	>303
13	Cl	0.08	>100	>1250
14	Br	0.14	>100	>714
15	I	0.20	>100	>500
16	F	0.57	>100	>175
17	OCH ₃	0.32	>100	>313
18		0.40	>100	>250
19	NH ₂	0.27	>100	>370
20	NHCHO	0.26	>100	>385
21		0.26	>100	>385
22	NC	0.11	10-100	>90

ル、イミド、アミノ基、アミド、およびイソシアノ基を有する全ての化合物において有効な付着阻害活性 (EC₅₀ 値; 0.08–0.57 µg/mL) が観察されるとともに、化合物 **22** を除いて高濃度 (100 µg/mL) においても毒性は観察されず、低毒性であることが示唆された。特に、ベンゾイル基およびクロロ基を有する化合物 **11** および **13** については、EC₅₀ 値が 0.08 µg/mL であり、非常に強い付着阻害活性が観察された。さらには、全ての化合物において、1 µg/mL または 3 µg/mL の濃度にて 95% 以上の付着阻害率が観察されたが、それらの濃度でも幼生の死亡率はほとんどゼロであり、忌避的に付着を阻害していることが示唆された。ここで、化合物の安全性の指標となる安全域について見てみると、一番低い化合物 **22** でも >90 であり、化合物 **11** については、>1250 と非常に大きい値を示した。文献によると、安全域が 15 を超える化合物については、非毒性の付着防汚剤として期待できると

報告されていることから (Qian et al., 2010)、 β -シトロネロール誘導体イソニトリル化合物は、有望な“環境にやさしい”付着防汚剤候補であるといえる。なお、化合物 **11** は、シトロネロール7より3段階、71%の収率で合成される (Mihara et al., 2014)。収率の点だけから判断すると、化合物 **5** と比べる合成効率性は劣るように見えるが、使用する試薬のコストや合成方法等含めて総合的に判断すると、化合物 **11** は実用化が期待できる化合物であると考えられる。

3. アミノ酸誘導体イソニトリル化合物の合成と付着阻害活性

これまでに述べたように、イソニトリル化合物の多くは、タテジマフジツボキブリス幼生に対して、殺生することなく付着を阻害することから、“環境にやさしい”付着防汚剤として有望な化合物である。しかしながら、防汚剤の毒性に目を向けたとき、防汚剤自身の毒性だけでなく、その分解物にも考慮しなければならない。これまでに使用されている付着防汚剤は、防汚剤自身の毒性だけでなく、その分解物の毒性も懸念されている。その点から着目されたのがアミノ酸である。アミノ酸は、①アミノ基を有していることからイソニトリル化合物への変換が容易、②カルボキシ基部分も様々なエステルに変換が可能、③最終的に生分解されれば無毒性のアミノ酸へと変化、といった特徴を有している。以上をふまえて、タンパク質構成アミノ酸のアミノ基をイソシアノ基、カルボキシ基をベンジルエステルに変換したアミノ酸誘導体イソニトリル化合物が合成され、付着試験が行われた (Fukuda et al., 2016)。合成されたイソニトリル化合物の構造とタテジマフジツボキブリス幼生に対する付着阻害活性 (EC_{50})、死亡率 (LC_{50})、および安全域 (LC_{50}/EC_{50}) について表2に示す。なお、カルボキシ基部分がベンジルエステルとされたのは、分子量を大きくして化合物の揮発性を抑えるためである (低分子量のイソニトリル化合物は悪臭がするといわれている)。また、一部のアミノ酸誘導体 (Ser, Tyr, Asp, Glu, Lys および Gln) については、合成の容易さの観点から側鎖が修飾された構造で用意された。表2に示されているように、若干 EC_{50} 値が大きい化合物もあるが、全ての化合物において高濃度でも顕著な毒性を示すことなく、有効な付着阻害活性が観察された (EC_{50} 値; 0.14–10.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。特に、Phe 誘導体 (**29**) と Tyr 誘導体 (**30**) については、 LC_{50}/EC_{50} の値は、500を超えることが示唆された。また、シトロネロール誘導体イソニトリル化合物と同様に、フジツボキブリス幼生の付着を95%以上阻害する濃度においても、キブリス幼生は遊泳していて、忌避的に付着が阻害されていることが観察された。アミノ酸誘導体イソニトリルについては、実際の生分解性の速度等については検討していないが、構造から考察すると最終的には無毒性のアミノ酸へと変換されることから、より環境調和型の付着防汚剤として利用されることが期

表2. アミノ酸誘導体イソニトリル化合物の構造とタテジマフジツボキブリス幼生に対する EC_{50} 、 LC_{50} 、および LC_{50}/EC_{50} 値

化合物番号 (アミノ酸名)	R	EC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	LC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	LC_{50}/EC_{50}
23 (Gly)	H	0.97	>100	>103
24 (Ala)	CH ₃	2.67	>100	>38
25 (Val)		1.60	>100	>63
26 (Leu)		1.51	84.02	56
27 (Ile)		1.41	58.29	41
28 (Ser)		7.99	>100	>13
29 (Phe)		0.14	>100	>714
30 (Tyr)		0.17	>100	>588
31 (Trp)		3.94	>100	>25
32 (Met)		3.97	43.79	11
33 (Asp)		5.49	43.22	7.9
34 (Glu)		3.96	>100	>25
35 (Lys)		2.63	>100	>38
36 (Gln)		10.34	>100	>9.7

待される。以上、述べたように、多くのアミノ酸誘導体イソニトリルは有効な付着阻害活性を示した。しかしながら、これらの化合物は合成の観点からすべて立体異性体の混合物として用意されていた。そこで、立体異性体の存在しない、 α,α -二置換アミノ酸誘導体イソニトリルが合成され、付着試験が行われた (Inoue et al., 2018)。合成されたイソニトリル化合物の構造とタテジマフジツボキブリス幼生に対する付着阻害活性 (EC_{50})、死亡率 (LC_{50})、および安全域 (LC_{50}/EC_{50}) について表3に示す。表3に示されているように、Ala 誘導体 (**37**)、Glu 誘導体 (**45**)、および Lys 誘導体 (**46**) においては、一置換のアミノ酸誘導体イソニトリルに比べて、 EC_{50} 値がかなり大きくなったが、その他の化合物については、一置換体と同様、または強い付着阻害活性が観察された (EC_{50} 値; 0.07–7.30 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。特に、Val 誘導体 (**38**)、Phe 誘導体 (**41**) および Met 誘導体 (**43**) については、非常に高い付着阻害活性が見られた。また、全ての化合物におい

図5. フジツボキプリス幼生の蛍光顕微鏡下における観察画像（左）蛍光標識化合物作用（右）蛍光標識化合物 **48** を作用させた後

表3. α,α -二置換アミノ酸誘導体イソニトリル化合物の構造とタデジマフジツボキプリス幼生に対する EC_{50} 、 LC_{50} 、および LC_{50}/EC_{50} 値

<div style="text-align: center;"> 37-47 </div>				
化合物番号 (アミノ酸名)	R	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	LC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	LC_{50}/EC_{50}
37 (Ala)	CH ₃	313	>100	>0.3
38 (Val)		0.07	>30	>429
39 (Leu)		0.30	>100	>333
40 (Ser)		1.44	>100	>69
41 (Phe)		0.14	>30	>214
42 (Tyr)		2.14	>30	>14
43 (Met)		0.07	>100	>1429
44 (Asp)		7.30	>100	14
45 (Glu)		150	>100	>0.67
46 (Lys)		61.2	>100	>1.6
47 (Gln)		1.45	>30	>21

て高濃度でも顕著な毒性は見られなかった。なお、 LC_{50} 値が $>30 \mu\text{g/mL}$ となっている化合物は、それ以上の濃度で付着試験を行っていないので、より高い数値が観察される可能性がある。また、有効な付着阻害活性を示した化合物については、一置換体と同様に、キプリス幼生の付着を95%以上阻害する濃度においても、死亡率がほとんどゼロであることが観察された。一方、Phe誘導体

(**41**)の合成について述べると、条件の最適化は行っていないが、市販の化合物（グリシンベンジルエステル）より3段階、60%の収率で合成される。こちらも収率の点だけから判断すると、化合物**5**と比べる合成効率性は劣るように見えるが、使用する試薬のコストや合成方法等を含めて総合的に判断すると、化合物**41**は実用化が期待できる化合物であると考えられる。

4. イソニトリル化合物の付着阻害活性発現メカニズムの考察

これまで、イソニトリル化合物に付着阻害活性があることを述べてきたが、付着阻害活性はどのようなメカニズムで発現するのだろうか。付着阻害活性発現メカニズムの解明を目的とし、イソニトリル化合物の作用部位を特定するための検討として、イソシアノ基とダンシル基を有する蛍光プローブ化合物 (**48**) を合成した。そして、蛍光標識されたイソニトリル化合物について、同様の付着試験を行い、フジツボキプリス幼生への影響を蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、キプリス幼生の油球部分（油球は、摂餌を行わないキプリス期の幼生の栄養源とされている）に特異的な蛍光が観察された（図5）（Kitano et al., 2005）。また、その後の検討によって、イソニトリル化合物以外でも、比較的高い付着阻害活性が観察された化合物は、油球への取り込みが他の化合物に比べて多いことが観察され、油球部分がフジツボキプリス幼生の付着になんらかの影響を及ぼしている可能性が示唆された（Fujiwara et al., 2013）。さらには、イソニトリル化合物を末端に保持したアフィニティプローブを作製し、ブルダウンアッセイにより結合タンパク質の解析を行った結果、ミトコンドリアの機能に影響している可能性が示唆された（Zhang et al., 2012）。ただし、まだイソニトリル化合物の明確な付着阻害活性の発現メカニズムを説明することは難しく、今後さらなる検討が必要である。なお、イソニトリル化合物以外の付着阻害物質の付着阻害活性発現機構の解明については他の総説を参考にしたい（Qian et al., 2013）。

おわりに

以上述べたように、合成された様々なイソニトリル化合物は、フジツボキプリス幼生に対して、顕著な毒性を示すことなく有効な付着阻害活性を示した。これら化合物の海洋評価試験に関しては、紙面の都合上等で詳しくは述べないが、一定期間であれば市販品と同等の防汚効果が観察された結果も得られている。今後は、より多くのイソニトリル化合物について、詳細な海洋評価試験が実施されるとともに、活性発現メカニズムの解明も行われることによって、“環境にやさしい” 付着防汚剤として利用されることが期待される。

引用文献

- Fujiwara, S., C. Akima, E. Yoshimura, Y. Nogata, K. Chiba and Y. Kitano (2013). Bio-organic and anti-barnacle studies of fluorescence-labeled probe compounds against cyprids of barnacles. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, 445, 88–92.
- Fukuda, T., H. Wagatsuma, Y. Kominami, Y. Nogata, E. Yoshimura, K. Chiba and Y. Kitano (2016). Anti-barnacle activity of isocyanides derived from amino acids. *Chem. Biodivers.*, 13, 1502–1510.
- Fusetani, N. (2004). Biofouling and antifouling. *Nat. Prod. Rep.*, 21, 94–104.
- Fusetani, N., H. Hirota, T. Okino, Y. Tomono and E. Yoshimura (1996). Antifouling activity of isocyanoterpenoids and related compounds isolated from a marine sponge and nudibranchs. *J. Nat. Toxins*, 5, 249–259.
- Hirota, H., Y. Tomono and N. Fusetani (1996). Terpenoids with antifouling activity against barnacle larvae from the marine sponge *Acanthella cavernosa*. *Tetrahedron*, 52, 2359–2368.
- Hirota, H., T. Okino, E. Yoshimura and N. Fusetani (1998). Five new antifouling sesquiterpenes from two marine sponges of the genus *Axinyssa* and the nudibranch *Phyllidia pustulosa*. *Tetrahedron*, 54, 13971–13980.
- Inoue, Y., S. Takashima, Y. Nogata, E. Yoshimura, K. Chiba and Y. Kitano (2018). Isocyanides derived from α,α -disubstituted amino acids: synthesis and antifouling activity assessment. *Chemist. Biodivers.*, 15, e1700571.
- Kitano, Y., C. Akima, E. Yoshimura and Y. Nogata (2011). Anti-barnacle activity of novel simple alkyl isocyanides derived from citronellol. *Biofouling*, 27, 201–205.
- 北野克和・野方靖行 (2006). フジツボに対する付着阻害物質の探索方法および利用検討. 「フジツボ類の最新学 知られざる固着性甲殻類と人とのかわり」(日本付着生物学会編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 225–246.
- Kitano, Y., Y. Nogata, K. Matsumura, E. Yoshimura, K. Chiba, M. Tada and I. Sakaguchi (2005). Design and synthesis of anti-barnacle active fluorescence-labeled probe compounds and direct observation of the target region in barnacle cypris larvae for dimethyl-isocyanalkyl compounds. *Tetrahedron*, 61, 9969–9973.
- Kitano, Y., Y. Nogata, K. Shinshima, E. Yoshimura, K. Chiba, M. Tada and I. Sakaguchi (2004). Synthesis and anti-barnacle activities of novel isocyanocyclohexane compounds containing an ester or an ether functional group. *Biofouling*, 20, 93–100.
- Kitano, Y., A. Yokoyama, Y. Nogata, K. Shinshima, E. Yoshimura, K. Chiba, M. Tada and I. Sakaguchi (2003). Synthesis and anti-barnacle activities of novel 3-isocyantheonellin analogues. *Biofouling*, 19(suppl), 187–192.
- Kitano, Y., T. Ito, T. Suzuki, Y. Nogata, K. Shinshima, E. Yoshimura, K. Chiba, M. Tada and I. Sakaguchi (2002). Synthesis and antifouling activity of 3-isocyantheonellin and its analogues. *Perkin Trans.*, 1, 2251–2255.
- Mihara, K., I. Okada, K. Chiba and Y. Kitano (2014). Facile synthesis of N-substituted amides from alkenes and amides by a Brønsted acid mediated electrophilic addition reaction. *Synthesis*, 46, 1455–1462.
- 内藤昌信・藤木直也 (2004). 解説「海洋保全のための有機・無期ナノ複合材料を開発—精密設計ナノ高分子網目によるマリンバイオテクノロジー」. *化学と工業*, 57, 951–953.
- Nogata, Y. and Y. Kitano (2006). Isocyan compounds as non-toxic antifoulants. In: *Antifouling Compounds*, eds. N. Fusetani and A. S. Clare, Springer, Heidelberg, pp. 87–104.
- Nogata, Y., Y. Kitano, E. Yoshimura, K. Shinshima and I. Sakaguchi (2004). Antifouling activity of synthetic simple isocyanides against the barnacle *Balanus amphitrite* larvae. *Biofouling*, 20, 87–91.
- Okino, T., E. Yoshimura, H. Hirota and N. Fusetani (1995). Antifouling kalihinenes from the marine sponge *Acanthella cavernosa*. *Tetrahedron Lett.*, 36, 8637–8640.
- Okino, T., E. Yoshimura, H. Hirota and N. Fusetani (1996a). New antifouling sesquiterpenes from four nudibranchs of the family Phyllidiidae. *Tetrahedron*, 52, 9447–9454.
- Okino, T., E. Yoshimura, H. Hirota and N. Fusetani (1996b). New antifouling kalihipyranes from the marine sponge *Acanthella cavernosa*. *J. Nat. Prod.*, 59, 1081–1083.
- Qian, P.-Y., L. Chen and Y. Xu (2013). Mini-review: Molecular mechanism of antifouling compounds. *Biofouling*, 29, 381–400.
- Qian, P.-Y., Y. Xu and N. Fusetani (2010). Natural products as antifouling compounds: Recent progress and future perspectives. *Biofouling*, 26, 223–234.
- Zhang, Y.-F., Y. Kitano, Y. Nogata, Y. Zhang and P.-Y. Qian (2012). The mode of action of isocyanide in three aquatic organisms, *Balanus amphitrite*, *Bugula neritina* and *Danio rerio*. *PLoS ONE*, 7, 45442.