

【総説】

Small RNA による多剤耐性制御

西野 邦彦^{1,4)}・山崎 聖司^{1~3)}・西野-林美都子¹⁾・山口 明人^{2,3)}

¹⁾ 大阪大学産業科学研究所特別プロジェクト研究部門感染制御学研究分野*

²⁾ 同 生体応答科学研究部門生体情報制御学研究分野

³⁾ 大阪大学大学院薬学研究科細胞生物学分野

⁴⁾ 科学技術振興機構さきがけ

(平成 22 年 11 月 30 日受付・平成 22 年 12 月 8 日受理)

細菌はさまざまな外界の環境に適応するための機構を保持している。外環境に適応するために細菌は環境の変化を感知し、それに応じて遺伝子の発現を制御している。遺伝子の発現は複雑で巧妙なさまざまなシステムによって制御されている。細菌において、アミノ酸をコードせず、自身で機能をもつ非翻訳型 RNA の存在が知られている。特に、500 塩基以下の低分子非翻訳型である small RNA が、標的 mRNA と塩基対を形成することにより翻訳を抑制または促進したり、mRNA 分解を引き起こすことで、転写後の遺伝子発現制御に重要な役割を担っていることがわかってきた。ゲノム情報に基づくスクリーニングから、各種細菌において多くの small RNA が同定されてきた。また、これら small RNA が細菌のストレス応答、クオラムセンシングや病原性の調節に関与していることが報告されている。長らく small RNA と細菌の薬剤耐性との関係については不明であったが、近年、多剤耐性制御に関与していることがわかってきた。本総説では、small RNA による細菌薬剤感受性調節の機構について、最近得られた知見を紹介する。

Key words: drug efflux system, multidrug resistance, small RNA

近年の研究の進展から、非翻訳型である non-coding RNA (ncRNA) が、さまざまな生命現象において重要な役割を果たしていることが明らかになっている¹⁾。かつて、ncRNA はジャンクと考えられていたが、ゲノム解析が進み、これがヒトゲノム RNA の 98% を占めることが明らかになり、注目されるようになった。研究が進むにつれ、ncRNA のなかには、さまざまな状況下において巧妙な遺伝子発現制御を行っている non-coding regulatory RNA が存在することがわかってきた²⁾。このような RNA は、mRNA に比べて短いため、small RNA と総称されることが多い。Small RNA には、高等生物に見出されている~22 スクレオチド (nt) の長さである microRNA や細菌で見つかった 50~400 nt の sRNA が含まれ、両者とも転写後の発現制御において重要な役割を担っている。

microRNA とほとんどの細菌 sRNA は、一般的に、標的である mRNA と塩基対を形成することにより、制御機能を発揮する。例えば、3'-非翻訳領域 (UTR) やコーディング領域 (CDS) に microRNA が作用すると、mRNA の脱アデニル化や分解が促進され、翻訳調節を含むさまざまな機構を介して、多くの場合、遺伝子発現が抑制される³⁾。また、逆に、microRNA が発現を促進させる場合があることも報告されてい

る⁴⁾。同様に、細菌の sRNA は 5'mRNA 領域と塩基対を形成することで、ほとんどの場合、標的の発現を抑制する⁵⁾。典型的には、sRNA による塩基対形成は、リボソーム結合サイト (RBS) をマスクすることにより 30S リボソームの結合と翻訳開始を阻害する。結果的に、翻訳されなかった mRNA は、RNase E^{6,7)} または RNase III^{8,9)} の作用によって分解される。sRNA による抑制効果は、RBS を標的としたものだけに限られているわけではなく、他にもさまざまな機構が報告されている^{10~14)}。

細菌のゲノム解析が進むにつれ、ゲノム情報に基づいたコンピューター予想やマイクロアレイ法、RNA 結合蛋白質 Hfq との共沈法などにより、多数の sRNA が発見された。大腸菌においては、これまでに約 80 種の small RNA が同定されている。その多くは機能不明であるが、ストレス応答¹⁵⁾、酸耐性¹⁶⁾、クオラムセンシング^{17,18)} や病原性¹⁹⁾ の制御に関与していることがわかってきた。一方、small RNA と細菌の薬剤耐性との関係については長らく不明であったが、近年、多剤耐性制御に関与していることがわかってきた。本稿では、small RNA による多剤耐性制御について筆者らの研究を中心に紹介したい。

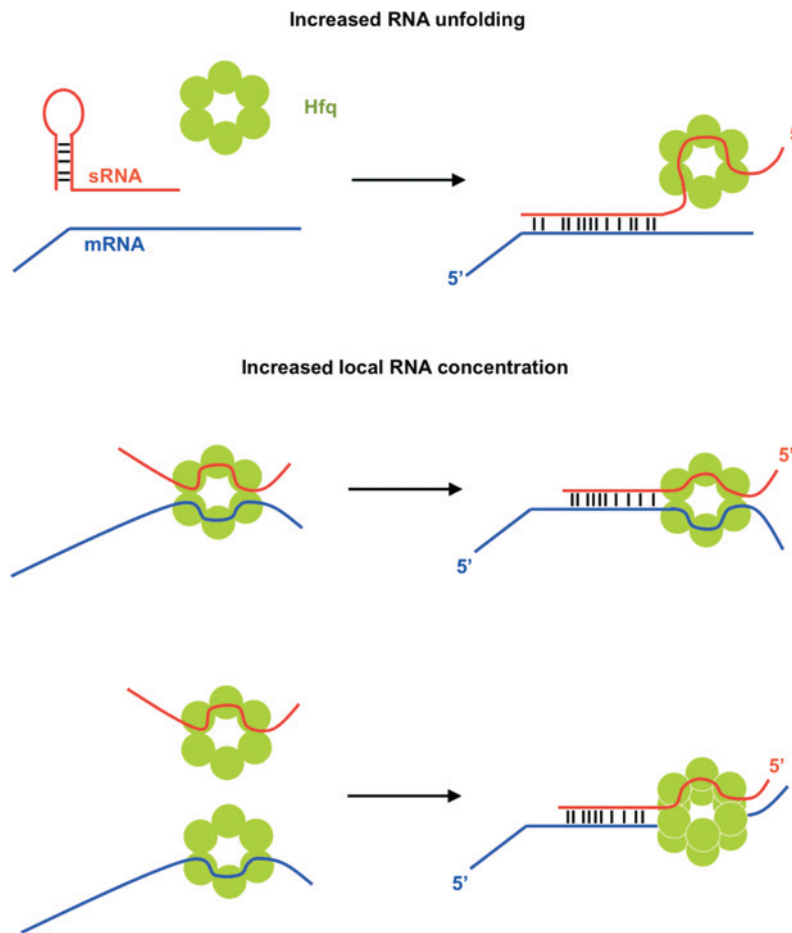


Fig. 1. Mechanisms by which Hfq might facilitate sRNA-mRNA basepairing. Hfq (green ring) may promote RNA unfolding or may increase the local concentrations of the sRNA (red) and its mRNA target (blue)²³.

I-1. RNA シャペロン Hfq の特徴

sRNA は、標的 mRNA の翻訳開始部分と部分的な塩基対を形成することで、翻訳の抑制や mRNA の安定性を調節するが、sRNA の作用には RNA 結合性蛋白質 Hfq が必要となる。もともと Hfq は、大腸菌において Q β バクテリオファージの複製に必要な因子として同定された²⁰。Hfq は真核生物のスプライシング複合体に含まれる Sm/Sm 様蛋白質のホモログで、ドーナツ型のホモ 6 量体を形成する²¹。研究が進むにつれ、RNA シャペロンである Hfq は、sRNA と mRNA の両方に結合し、一本鎖標的 mRNA の AU リッチな配列への sRNA の結合を促進させることがわかってきた²²。Hfq がどのようにして、sRNA の標的への結合を促進させているか、その機構は完全には未だ理解されていないが、Fig. 1 のような機構が考えられている²³。例えば、Hfq が RNA に結合し、ステムループを形成している部分を開けるような構造の変化をもたらすことで、標的との塩基対形成を促進する機構がある。また、Hfq が局所的に sRNA の濃度を高めることで、塩基対の形成を促進させる機構も考えられる。これは、1 つの 6 量体 Hfq が sRNA と標的 mRNA に同

時に結合する場合と、sRNA に結合した Hfq が、mRNA に結合した Hfq と相互作用する機構が考えられる²⁴。数多くの転写調節因子が、sRNA によって転写後調節を受けていることから、Hfq は多くの細菌のフェノタイプの制御に関与する (Fig. 2)²⁵。近年、Hfq は細菌の病原性制御にも関与していることがわかってきた²⁶。しかしながら、薬剤耐性と Hfq の関係については、これまでよくわかっていなかった。

I-2. Hfq が大腸菌薬剤感受性に与える影響

著者らは、Hfq の大腸菌薬剤感受性における役割を調べるため、*hfq* 遺伝子欠損株を作成した。Table 1 に示すように、*hfq* 遺伝子欠損株は、クロラムフェニコール (野生株に対して 4 倍)、ノボビオシン (4 倍)、アクリフラビン (8 倍)、クリスタルバイオレット (4 倍)、ローダミン 6 G (>4 倍)、塩化ベンザルコニウム (8 倍)、オキサシリン (4 倍)、セファマンドール (4 倍)、ナリジキス酸 (4 倍) などの化合物に対して、野生株に比べ、感受性化していた。この現象は、*hfq* 遺伝子をクローニングしたプラスミドを *hfq* 欠損株に導入することにより、補われた。

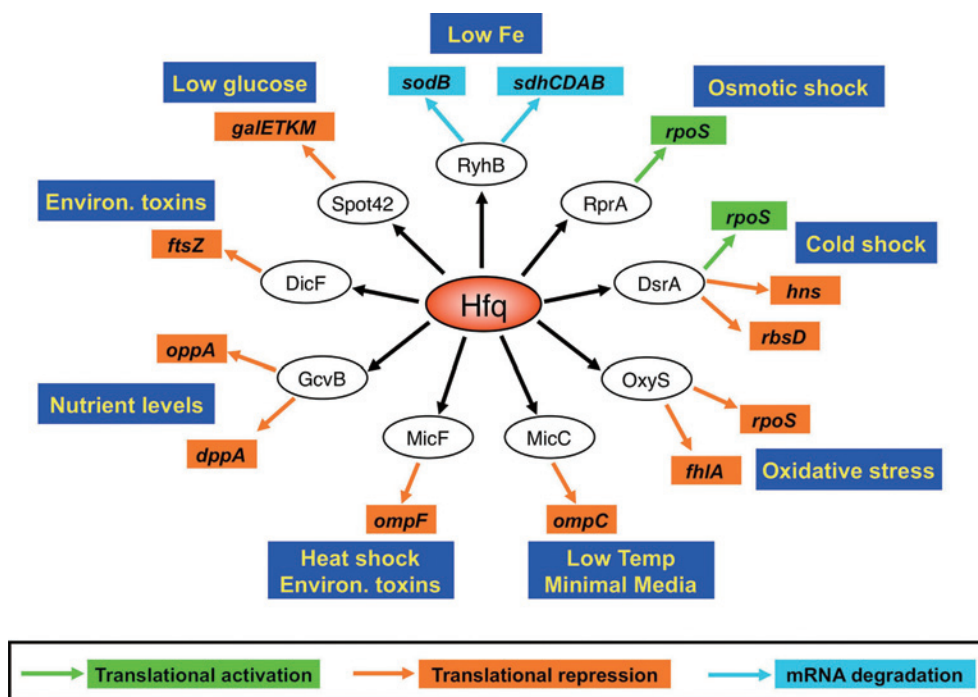


Fig. 2. Phenotypes and factors controlled by the RNA chaperone Hfq.

Table 1. Susceptibility of *E. coli* strains to toxic compounds

Strain	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)								
	CP	NOV	ACR	CV	R6G	BENZ	OXA	CMD	NA
Wild-type	4	128	256	32	>512	64	256	0.5	4
Δhfq	1	32	32	8	128	8	64	0.13	1
$\Delta hfq/\text{vector}$	1	32	32	8	128	8	N.D.	N.D.	1
$\Delta hfq/phfq$	4	128	256	32	>512	64	N.D.	N.D.	4
$\Delta acrAB$	0.5	2	8	1	2	4	1	0.063	1
$\Delta acrAB\Delta hfq$	0.5	1	8	1	2	4	1	0.063	1

CP, chloramphenicol; NOV, novobiocin; ACR, acriflavine; CV, crystal violet; R6G, rhodamine 6G; BENZ, benzalkonium; OXA, oxacillin; CMD, cefamandole; NA, nalidixic acid.

I-3. Hfq は大腸菌の薬剤蓄積量に影響する

多剤耐性化にかかわる原因の一つとして、薬剤の能動的排出機構があげられる²⁷⁾。薬剤排出が亢進した菌では、菌体内の薬剤蓄積量が減少する。著者等は、Hfq が大腸菌薬剤蓄積量に及ぼす影響を調べるため、野生株、*hfq* 欠損株、そして大腸菌の主要な薬剤排出遺伝子である *acrAB* の欠損株を、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ローダミン 6G を含む寒天培地に接種し、菌を培養した。ローダミン 6G は、この濃度では、各菌株の増殖は阻害しないが、寒天培地上の菌の色に差がみられた (Fig. 3)。野生株はローダミン 6G を含む寒天培地上において白色であるのに対して、*hfq* 欠損株と *acrAB* 欠損株は赤色を呈していた。これは、野生株に比べて *hfq* 欠損株と *acrAB* 欠損株では、薬剤蓄積量が増えているためであると考えられ、すなわち、これら両欠損株では、薬剤排出能が低下していることが示唆される。

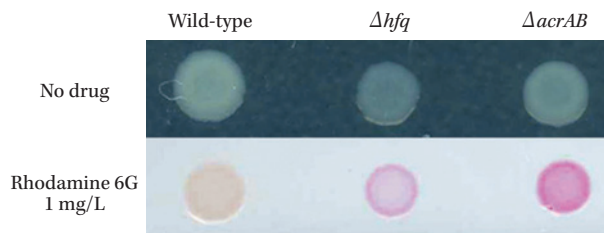


Fig. 3. Hfq affects drug accumulation in *E. coli*. Strains wild-type, Δhfq and $\Delta acrAB$ were spotted onto LB agar plates containing rhodamine 6G $1 \mu\text{g}/\text{mL}$. After incubation at 37°C for 20 h, *E. coli* colonies were observed under white light (visible waveband)³⁶⁾.

I-4. AcrAB 薬剤排出システムと Hfq による薬剤排出感受性調節の関係

これまでの結果より、*hfq* 欠損株では、薬剤排出能が低下していることが考えられる。以前、著者らは大腸菌の染色体上に少なくとも 20 個の薬剤排出遺伝子が存在し

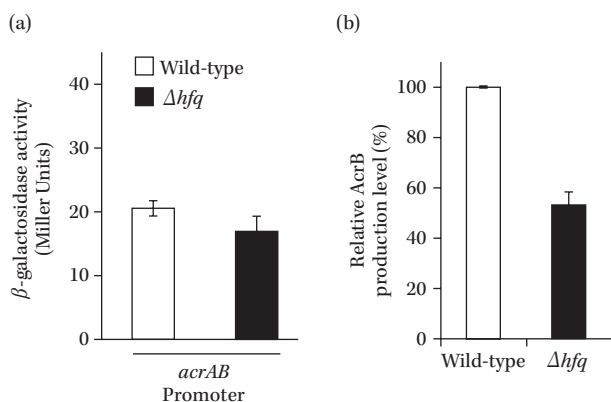


Fig. 4. (a) Effect of Hfq on the promoter activity of the AcrAB drug efflux system. Effect of *hfq* deletion on the promoter activity of the *acrAB* operon was determined. (b) Hfq affects the production level of the AcrB multidrug efflux protein. The relative amount of AcrB production was calculated by Western blotting analysis using Science Lab 2001 Image Gauge Ver. 4.0 software³⁶.

ていることを実験的に証明している²⁸。なかでも、AcrAB 多剤排出システムは強力に機能しており、数多くの化合物を認識して排出することにより、細菌の獲得耐性と自然耐性の両方に関与している²⁷。AcrAB 多剤排出システムが、Hfq による薬剤感受性調節に関与しているかどうかを調べるために、*acrAB* 遺伝子欠損株の薬剤感受性に、*hfq* 遺伝子欠損が、どのように影響するか解析を行った (Table 1)。野生株からの *hfq* 欠損は、上述の多くの薬剤に対する大腸菌の感受性を高めたにもかかわらず、*acrAB* 欠損株の薬剤感受性にはほとんど影響を及ぼさなかった。この結果は、Hfq による薬剤耐性調節に AcrAB 排出システムが関与していることを示している。

I-5. Hfq が AcrB 産生量に及ぼす影響

上記の結果より、AcrAB 薬剤排出システムが Hfq によって制御されている可能性が示唆された。まず、Hfq が AcrAB 発現に、転写レベルで影響しているかを調べるため、*acrAB* オペロンのプロモーター領域をクローニングした *lacZ* レポーターを保持するプラスミドを用いて、そのプロモーター活性を β-ガラクトシダーゼ活性を測定することにより解析した (Fig. 4a)。野生株と *hfq* 遺伝子欠損株の間で、*acrAB* オペロンのプロモーター活性に差は認められなかった。次に、抗 AcrB 抗体を用いたウェスタンブロッティング法により調べたところ、*hfq* 欠損株においては、野生株に比べて AcrB の蛋白質レベルでの発現量が 53% まで低下していた (Fig. 4b)。これらの結果から、Hfq は転写後のレベルで、AcrB 発現の調節に関与していると考えられる。

II-1. DsrA スモール RNA の特徴

スモール RNA である DsrA は、カプセル多糖合成の調節因子として発見されたものであり²⁹、その他にも、酸耐性や病原性に関与する遺伝子の制御に関与しているこ

Table 2. Susceptibility of *E. coli* strains to toxic compounds

Strain	MIC (mg/L)				
	OXA	MCIPC	EM	R6G	NOV
Wild-type	256	>512	128	>512	256
Δ <i>acrB</i>	0.5	1	4	2	2
Δ <i>acrB</i> /vector	0.5	1	4	2	2
Δ <i>acrB</i> /p <i>dsrA</i>	4	4	16	16	8
Δ <i>acrB</i> <i>mdtEF</i>	0.5	1	4	2	2
Δ <i>acrB</i> <i>mdtEF</i> /vector	0.5	1	4	2	2
Δ <i>acrB</i> <i>mdtEF</i> /p <i>dsrA</i>	0.5	1	4	2	2
Δ <i>acrB</i> <i>rpoS</i>	0.5	1	4	2	2
Δ <i>acrB</i> <i>rpoS</i> /vector	0.5	1	4	2	2
Δ <i>acrB</i> <i>rpoS</i> /p <i>dsrA</i>	0.5	1	4	2	2

OXA, oxacillin; MCIPC, cloxacillin; EM, erythromycin; R6G, rhodamine 6G; NOV, novobiocin.

とが報告されている^{16,19}。DsrA は *rpoS* の mRNA に対する正の制御因子であることが知られている³⁰。*rpoS* 遺伝子にコードされているシグマ因子である σS は、主要なストレス調節分子として機能しており、数多くの遺伝子の発現制御に関与している。DsrA は *rpoS* の自己抑制のためのヘアピン構造の部分に結合して、リボソーム結合サイトの自由度を高めることで、 σS の合成を促進させる³¹⁻³⁵。DsrA は細菌において最も研究が進んでいる sRNA であるが、これまで、薬剤耐性との関連は不明であった。

II-2. DsrA 発現が大腸菌薬剤感受性に及ぼす影響

大腸菌には少なくとも 20 個の薬剤排出システムが存在していることがわかっているが、なぜ、コンパクトなゲノム上にこれだけ多くのシステムが備わっているかは謎である。それを解くための方法の一つとして、大腸菌がいかなる状況でこれら薬剤排出システムを利用しているか、すなわち、薬剤排出システムの制御ネットワークを解析することが重要であると考えられる。大腸菌においては AcrAB 排出システムが恒常的に発現しているが、この他の薬剤排出システムがどのような因子によって制御されているのかを明らかにするために、著者らは、*acrB* 欠損株に大腸菌のプラスミドライブラリを導入し、薬剤耐性化に関与する因子のスクリーニングを行った。その結果、sRNA である DsrA を含むプラスミドが、*acrB* 欠損株をさまざまな薬剤に対して耐性化させることがわかった (Table 2)。DsrA 発現株は、親株に比べて、オキサシリン、クロキサシリン、エリスロマイシン、ローダミン 6G、ノボビオシンなどに耐性化していた。

II-3. DsrA による薬剤蓄積軽減効果

DsrA による薬剤耐性化機構を明らかにするために、*acrB* 欠損株にベクターを導入した株と、DsrA を含むプラスミドを導入した株を用いて、薬剤の蓄積を観察した。両菌株を 1 μg/mL の臭化エチジウムを含んだ寒天培地にスポットし、培養した後、UV を照射することで、菌体への臭化エチジウムの蓄積を観察した。Fig. 5 に示すよ

うに、臭化エチジウムは、菌の増殖は阻害していないが、UV を照射した時の蛍光強度に両菌株の間で差が認められた。DsrA 発現株では蛍光が著しく減少していることから、本菌株では、薬剤蓄積が減少していることがわかる。この結果から、DsrA は大腸菌の薬剤排出活性に影響を及ぼすことが強く示唆された。

II-4. DsrA による MdtEF 多剤排出システムの制御

上記の一連の結果から、DsrA は、大腸菌に存在するいずれかの薬剤排出システムを正に制御していることが考

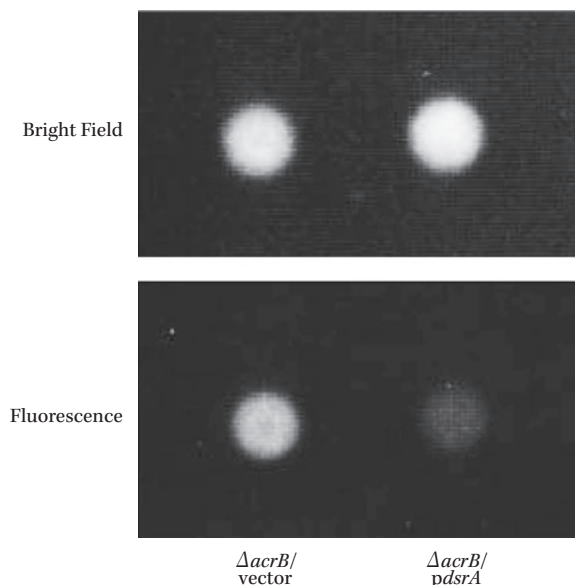


Fig. 5. Effect of *dsrA* overexpression on drug accumulation in *Escherichia coli* cells.

Strains $\Delta\text{acrB}/\text{vector}$ and $\Delta\text{acrB}/\text{pdsrA}$ were spotted on LB agar plates containing 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ethidium bromide at a final inoculum size of 10^5 CFU/spot. After incubation, *E. coli* colonies were observed under white light (visible waveband, bright field) and UV light (fluorescence)³⁷.

えられた。どの薬剤排出システムが DsrA によって制御されているのかを明らかにするため、qRT-PCR 法により、20 個の薬剤排出システムと多くの薬剤排出システムが利用する外膜蛋白質である TolC の転写量を測定した (Fig. 6)。その結果、DsrA 発現株においては、野生株と比べて、MdtEF 薬剤排出システムの転写量が顕著に上昇していることがわかった。また、*acrB* と *mdtEF* の両遺伝子を同時に欠損させた株においては、DsrA を発現させても、薬剤耐性化は起こらなかったことから (Table 2)、DsrA による多剤耐性化は、MdtEF 薬剤排出システムの発現が上昇したためであることがわかった。また、*rpoS* 欠損株では、DsrA による MdtEF の発現上昇とそれに伴う薬剤耐性化が観察されなかったことから (Table 2)、DsrA は RpoS を介して、MdtEF の発現を正に制御していることがわかった。

III. おわりに

本総説では、最近得られた著者らの結果を中心に、small RNA と細菌薬剤耐性制御の関係について紹介した。RNA シャペロンである Hfq は、薬剤排出蛋白質 AcrB の転写後調節を行うことで、薬剤耐性制御に関係していることを明らかにした³⁶。また、sRNA である DsrA が、シグマ因子である RpoS を介して、MdtEF 薬剤排出システムを制御することにより、大腸菌の薬剤耐性に関係していることを認めた³⁷。sRNA による薬剤耐性制御の研究は、まだ、始まったばかりであるが、他の菌においてもこのような sRNA による薬剤耐性制御が普遍的に存在していると考えている。Hfq がどのようにして薬剤排出蛋白質の制御に関与しているのか、その分子機構の詳細はまだわかっていない部分が多い。また、sRNA によって薬剤排出システムが制御されていることはわかったが、これら制御ネットワークがどのような環境で必要になり、薬剤排出システムが誘導されるのか、そして、その環境において薬剤排出システムの発現誘導

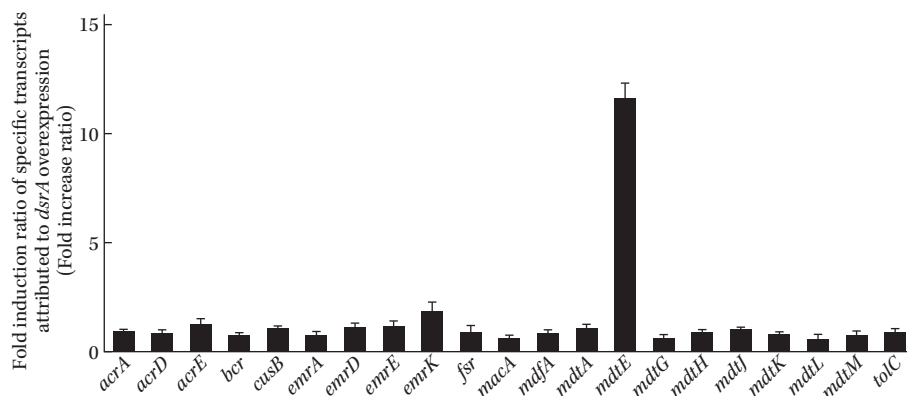


Fig. 6. Effect of DsrA on expression levels of drug efflux and outer membrane channel genes. The level of mRNA transcript was determined by qRT-PCR. The fold change ratio was calculated by dividing the expression level of the gene in the *dsrA*-overexpressed strain by that in the parental strain³⁷.

は生理的にどのような意味をもつのかといった疑問が残されている。さらに、sRNAによる多剤耐性制御は臨床においてどの程度の重要性をもつのか、そして、sRNAを利用もしくは標的とした病原性・薬剤耐性を軽減する新規抗菌薬の開発といった課題にも今後取り組まなくてはならないと考えている。

謝 辞

本稿における研究の一部は、日本ワックスマン財団の支援のもと行われました。

文 献

- 1) Barciszewski J, Erdmann V A: Noncoding RNAs. In Molecular biology and molecular medicine. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003
- 2) Moazed D: Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. Nature 2009; 457: 413-20
- 3) Wu L, Belasco J G: Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. Mol Cell 2008; 29: 1-7
- 4) Brodersen P, Voinnet O: Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. Nat Rev Mol Cell Biol 2009; 10: 141-8
- 5) Waters L S, Storz G: Regulatory RNAs in bacteria. Cell 2009; 136: 615-28
- 6) Morita T, Maki K, Aiba H: RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. Genes Dev 2005; 19: 2176-86
- 7) Massé E, Escorcia F E, Gottesman S: Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. Genes Dev 2003; 17: 2374-83
- 8) Boisset S, Geissmann T, Huntzinger E, Fechter P, Bendridi N, Possedko M, et al: *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. Genes Dev 2007; 21: 1353-66
- 9) Vogel J, Argaman L, Wagner E G, Altuvia S: The small RNA IstR inhibits synthesis of an SOS-induced toxic peptide. Curr Biol 2004; 14: 2271-6
- 10) Darfeuille F, Unoson C, Vogel J, Wagner E G: An antisense RNA inhibits translation by competing with standby ribosomes. Mol Cell 2007; 26: 381-92
- 11) Sharma C M, Darfeuille F, Plantinga T H, Vogel J: A small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside and upstream of ribosome-binding sites. Genes Dev 2007; 21: 2804-17
- 12) Vecerek B, Moll I, Blasi U: Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding. EMBO J 2007; 26: 965-75
- 13) Pfeiffer V, Papenfort K, Lucchini S, Hinton J C, Vogel J: Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation. Nat Struct Mol Biol 2009; 16: 840-6
- 14) Desnoyers G, Morissette A, Prevost K, Masse E: Small RNA-induced differential degradation of the polycistronic mRNA iscRSUA. EMBO J 2009; 28: 1551-61
- 15) Gottesman S: Stealth regulation: biological circuits with small RNA switches. Genes Dev 2002; 16: 2829-42
- 16) Lease R A, Smith D, McDonough K, Belfort M: The small noncoding DsrA RNA is an acid resistance regulator in *Escherichia coli*. J Bacteriol 2004; 186: 6179-85
- 17) Lenz D H, Mok K C, Lilley B N, Kulkarni R V, Wingreen N S, Bassler B L: The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. Cell 2004; 118: 69-82
- 18) Li J, Attila C, Wang L, Wood T K, Valdes J J, Bentley W E: Quorum sensing in *Escherichia coli* is signaled by AI-2/LsrR: effects on small RNA and biofilm architecture. J Bacteriol 2007; 189: 6011-20
- 19) Laaberki M H, Janabi N, Oswald E, Repoila F: Concert of regulators to switch on LEE expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7: interplay between Ler, GrlA, HNS and RpoS. Int J Med Microbiol 2006; 296: 197-210
- 20) Franze de Fernandez M T, Eoyang L, August J T: Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Qbeta-RNA. Nature 1968; 219: 588-90
- 21) Møller T, Franch T, Højrup P, Keene D R, Bächinger H P, Brennan R G, et al: Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. Mol Cell 2002; 9: 23-30
- 22) Zhang A, Wassarman K M, Ortega J, Steven A C, Storz G: The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs. Mol Cell 2002; 9: 11-22
- 23) Storz G, Opdyke J A, Zhang A: Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. Curr Opin Microbiol 2004; 7: 140-4
- 24) Schumacher M A, Pearson R F, Møller T, Valentin-Hansen P, Brennan R G: Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein. EMBO J 2002; 21: 3546-56
- 25) Tsui H C, Leung H C, Winkler M E: Characterization of broadly pleiotropic phenotypes caused by an *hfq* insertion mutation in *Escherichia coli* K-12. Mol Microbiol 1994; 13: 35-49
- 26) Hansen A M, Kaper J B: Hfq affects the expression of the LEE pathogenicity island in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. Mol Microbiol 2009; 73: 446-65
- 27) Nikaido H: Multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. J Bacteriol 1996; 178: 5853-9
- 28) Nishino K, Yamaguchi A: Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. J Bacteriol 2001; 183: 5803-12
- 29) Sledjeski D, Gottesman S: A small RNA acts as an antisilencer of the H-NS-silenced *rcaA* gene of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 2003-7
- 30) Sledjeski D D, Gupta A, Gottesman S: The small RNA, DsrA, is essential for the low temperature expression of RpoS during exponential growth in *Escherichia coli*. EMBO J 1996; 15: 3993-4000
- 31) Resch A, Afonyushkin T, Lombo T B, McDowall K J,

- Blasi U, Kaberdin V R: Translational activation by the noncoding RNA DsrA involves alternative RNase III processing in the *rpoS* 5'-leader. *RNA* 2008; 14: 454-9
- 32) Lease R A, Cusick M E, Belfort M: Riboregulation in *Escherichia coli*: DsrA RNA acts by RNA: RNA interactions at multiple loci. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 12456-61
- 33) Majdalani N, Cunning C, Sledjeski D, Elliott T, Gottesman S: DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 12462-7
- 34) Soper T J, Woodson S A: The *rpoS* mRNA leader recruits Hfq to facilitate annealing with DsrA sRNA. *RNA* 2008; 14: 1907-17
- 35) Sledjeski D D, Whitman C, Zhang A: Hfq is necessary for regulation by the untranslated RNA DsrA. *J Bacteriol* 2001; 183: 1997-2005
- 36) Yamada J, Yamasaki S, Hirakawa H, Hayashi-Nishino M, Yamaguchi A: Impact of the RNA chaperone Hfq on multidrug resistance in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 853-8
- 37) Nishino K, Yamasaki S, Hayashi-Nishino M, Yamaguchi A: Effect of overexpression of small noncoding DsrA RNA on multidrug efflux in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2010 Nov 18; doi: 10.1093/jac/dkq420 [Epub ahead of print]

Small RNA-mediated bacterial multidrug resistance

Kunihiko Nishino^{1,4)}, Seiji Yamasaki¹⁻³⁾, Mitsuko Hayashi-Nishino¹⁾ and Akihito Yamaguchi^{2,3)}

¹⁾ Laboratory of Microbiology and Infectious Diseases, Division of Special Projects, Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, 8-1 Mihogaoka, Ibaraki, Osaka, Japan

²⁾ Department of Cell Membrane Biology, Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University

³⁾ Department of Cell Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

⁴⁾ PRESTO, Japan Science and Technology Agency

Bacteria have developed regulatory systems for eliciting a variety of adaptive responses to their environments. A number of 40–400 nucleotide RNAs, that do not encode proteins or function as tRNAs or rRNAs have been characterized in prokaryotic organisms. Because of their small sizes, these RNAs generally have been referred to as small RNAs in bacteria. More generally, these RNAs have been termed noncoding RNAs (ncRNAs). Small RNAs made from the opposite strand from their targets and therefore able to basepair extensively with their target mRNA have been described and studied as regulators of plasmid and phage functions for many years. More recent recognition of the importance of trans-acting small RNAs in regulation of bacterial gene expression, including genes involved in bacterial pathogenesis, has extended interest in these molecules, and has led to genome-wide searches for these small RNAs in *Escherichia coli*. Recent studies have led to the identification of nearly 80 small RNAs in *E. coli*. However, only a subset of these RNAs has been characterized. It was reported that several small RNAs from *E. coli* coordinate stress responses and virulence factors. Despite the study of small RNAs in the bacterial regulatory network, their role in drug resistance has remained elusive. In this review article, we introduce the multidrug resistance mechanisms modulated by bacterial small RNAs.