

Research Article

Genome-wide association study identifies loci affecting resistance to Scuticociliatosis in olive flounders (*Paralichthys olivaceus*)

Yuju Lee^{1†}, Dain Lee^{2†}, Tae-Hee Kim¹, Minhwan Jeong², Julan Kim², Hyejin Kim², Chaehyeon Lim², Yoonji Chung³, Yeongkuk Kim⁴, Min-Sung Kim⁵, Seung-Hwan Lee³, Woojai Lee⁵, Hyun-Chul Kim^{2*}, Hee-Bok Park^{1,6*}

¹Department of Animal Resources Science, Kongju National University, Yesan, 32439, Korea

²Genetics and Breeding Research Center, National Institute of Fisheries Science, Geoje 53334, Korea

³Division of Animal and Dairy Science, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

⁴Quantomic, Daejeon 34167, Korea

⁵BLUGEN, Busan 48071, Korea

⁶Resource Science Research Institute, Kongju National University, Yesan 32439, Korea;

[†]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors: hckimgnu@korea.kr, heebokpark@kongju.ac.kr

ABSTRACT

Olive flounders (*Paralichthys olivaceus*) hold significant economic values in the aquaculture sector of South Korea. Scuticociliatosis, caused by several parasite species, poses an important threat to the aquaculture industry, particularly in olive flounders. Developing resistance to this disease is vital for sustainable aquaculture. In this study, we performed a genome-wide association study (GWAS) to identify genetic loci associated with Scuticociliatosis resistance in olive flounders. Using a time-to-event survival data as phenotype, we analyzed genomic data to detect loci affecting the Scuticociliatosis resistance. We identified the loci associated with the disease and the positional candidate genes, including *NEK7*, *ZNF362B*, *PTPRub*, *COL13A1*, *RB1*, *DPYSL5*, and *PC*. Further KEGG pathway analysis revealed significant enrichment in biological pathways such as ECM-receptor interaction, Focal adhesion, Platelet activation, Rap1 signaling, and Inositol phosphate metabolism, which are closely related with immune and inflammation responses. These findings provide insight into the genetic architecture of Scuticociliatosis resistance and can assist the development of breeding strategies for disease-resistant olive flounder.

Keywords: Scuticociliatosis, Time-to-event survival data, Genome-wide association study, biological pathways, Olive flounder

INTRODUCTION

2023년 한국의 국내 어업 생산량은 2010년에 비해 18.25% 증가하여 총 3,678,417톤에 이르렀다. 이 중 연근해어업은 2010년 대비 15.59% 감소한 반면, 해면양식어업은 67.48% 증가하여 2,269,357톤을 기록함으로써 양식어업의 식량 자원으로서 중요성이 점점 더 강조되고 있다(KOSIS, 2023). 넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 한국에서 가장 널리 양식되는 어종 중 하나로, 2010년 이후 양식어류 생산에서 큰 비중으로 차지하고 있다. 그러나 넙치 양식 산업은 어분 사료에 대한 의존도가 높고, 비효율적이며 비용이 많이 드는 생산 구조, 전염병 문제 등으로 지속 가능성에 큰 도전을 받고 있다(Lee et al, 2012; Kim, N. L. et al, 2023; Kim, W. et al, 2009).

Received November 29, 2024

Revised December 09, 2024

Accepted December 10, 2024

Copyright © 2024 Journal of Animal Breeding and Genomics.

 This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Scuticociliatosis (스쿠티카증)은 넙치와 같은 해양 어류에서 발생하는 기생충성 질병으로, 스쿠티카 목(*Scuticociliatia*)에 속하는 원생동물인 *Miamiensis avidus*, *Philasterides dicentrarchi*, *Uronema marinum* 등에 의해 유발된다. 이 질병은 다양한 어종에서 피부 병변, 행동 이상, 내부 장기 손상, 복수 등의 증상을 일으켜 높은 사망률을 초래할 수 있다(Iglesias et al, 2001; Harikrishnan et al, 2012; Turgay et al, 2015). 특히, 스쿠티카 원생동물은 어류의 피부나 아가미에 직접 부착하여 감염을 일으키며(Moustafa et al, 2010), 피부 접촉이 잦은 넙치의 경우 이러한 전염에 더욱 취약하다. 더불어, Scuticociliatosis은 넙치와 같은 고부가가치 어종을 양식하는 산업에 큰 경제적 손실을 초래할 수 있으며, 이는 어업의 지속 가능성뿐만 아니라 관련 산업의 수익성에도 부정적인 영향을 미칠 수 있다.

양식어류의 질병 내병성 증대를 위한 육종 및 개량 프로그램은 전염병으로 인한 높은 폐사율을 감소시키고 경제적 손실을 줄이는 데 중요한 역할을 담당 할 수 있다. 최근에는 특정 질병에 대한 내병성을 증대시키기 위해 DNA 마커를 이용한 마커 도움 선발(marker-assisted selection, MAS)과 유전체 선발(genomic selection, GS)이 도입되어, 선발 정확도와 육종가 예측의 신뢰성을 개선하고 있다(Yoshida et al, 2018; Tsai et al, 2016). 이러한 DNA 마커를 이용한 선발육종을 효율적으로 수행하려면 먼저 전장 유전체 관련성 분석(genome-wide association study, GWAS)을 통해 형질 변이에 관련성을 보이는 유전적 변이를 동정하는 과정이 필요하다. 이진형 형질(예: 생존 여부, 질병발생여부)을 다루는 GWAS에서는 로지스틱 회귀 모델이 일반적으로 사용되지만(Uffelmann et al, 2021), 이는 사건 발생 시점이나 관찰 기간을 충분히 반영하지 못한다는 한계가 있다. 이러한 time-to-event 형질 분석에는 Cox 비례위험 회귀(Cox proportional hazards regression)가 적합하며, 이를 통해 보다 정밀한 관련성 분석이 가능하고, 같은 제1종 오류 수준에서 로지스틱 회귀 모델보다 더 강력한 통계적 검정력(statistical power)을 제공한다(Hughey et al, 2019).

본 연구는 넙치 집단에서 Scuticociliatosis에 대한 내병성과 관련된 질병 연관 좌위를 동정하기 위해 수행하였고, 발견된 영역에서 후보 원인 유전자를 탐색하기 위해 수행되었다. 또한, 이들 후보 원인 유전자들의 생물학적 경로를 분석하여 내병성 메커니즘을 심층적으로 이해하고자 하였다.

MATERIALS AND METHODS

1. Experimental animals

넙치 실험집단(F7) 2,585마리는 2021년 4월 14일 국립수산과학원 어류육종센터에서 70마리의 수컷과 68마리의 암컷을 교배하여 생산하였다. 부모 개체와 본 연구에 사용된 넙치 개체들 간의 친자 관계는 10개의 microsatellite 마커를 이용한 유전자형을 분석을 통해 확인되었으며, 이는 연구센터에서 자체 개발한 Supermatch 프로그램을 사용하여 검증하였다. 생산된 넙치 집단(F7)은 자연광 주기하에서 18°C로 유지되는 3톤 순환 수조에서 사육되었다. 자어는 부화 후 3일부터 23일까지 L형 로티퍼를 급여하였고, 부화 후 13일부터 30일까지는 치어사료인 아르테미아(*artemia*)를 급여하였다. 또한, 부화 후 17일부터는 펠릿 사료의 급여량을 점진적으로 증가시켜 제공하였다. Scuticociliatosis 실험에 사용된 개체는 무작위로 선발하였으며, 선발 전 모든 개체의 건강 상태는 국립수산과학원의 수산생물 질병진단 지침에 따라 확인하였다. 세균성 질병원인균(에드워드, 연쇄구균, 비브리오)과 바이러스성 질병원인균(VHSV)은 PCR 검사를 통해 감염 여부를 확인하였고, 스쿠티카 감염 여부는 현미경 관찰을 통해, 활주세균증 여부는 육안으로 관찰하였다.

2. Scuticociliate challenge experiment and phenotype collection

Scuticociliatosis 실험을 위해 선정된 개체들은 수온이 $23 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 유지된 1톤 원형 수조로 옮겨져 실험에 사용되었다. Scuticociliatosis 인공 감염을 위해 감염된 실험어를 준비하였으며, 실험어의 감염 여부는 환부를 현미경으로 관찰하여 스쿠티카충이 존재하는 것을 확인한 후 수조에 투입하여 수평 감염이 일어나도록 하였다. 실험은 2022년 8월 2일에 시작되어 2022년 8월 14일 까지 진행되었으며, 매일 오전 9시와 오후 5시에 개체의 상태를 점검하고 샘플을 채취하였다. 실험 중 광주기는 15시간, 암주기는 9시간으로 설정하였고, 수질 관리는 하루 8.6회 회전수를 유지하면서 이루어졌다. 인위 감염 후 폐사한 넙치의 Scuticociliatosis 감염

여부는 매일 각 수조에서 폐사한 개체 중 3개체를 무작위로 선정하여 환부를 현미경으로 관찰함으로써 확인하였다. Scuticociliatosis 저항성에 대한 time-to-event (폐사) 표현형은 생존 여부(survival, SUR)와 폐사까지 걸린 일수(day to death, DTD)로 정의되었다. 실험 중 폐사한 개체의 SUR 값은 0으로, 생존한 개체는 1로 설정되었으며, 생존기간에 대한 실험 후 2일 동안 생존한 경우, DTD 값은 2로 기록하였다. DTD 값은 실험 기간 동안 13일까지 기록하였으며, 실험 종료 시점까지 생존한 개체들은 추가적인 생존 정보가 없으므로 right-censored 데이터로 처리하였다.

3. Development of the 60K SNP array

넙치 100개체에서 추출한 genomic DNA로 TruSeq DNA PCR-Free Kit (Illumina, USA)를 활용하여 시퀀싱 라이브러리를 제작하였다. 이후 Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, USA) 플랫폼의 pair-end 모드를 통해 전장 유전체 시퀀싱(whole-genome sequencing, WGS)을 수행하였다. 시퀀싱된 원시 데이터는 SOAPnuke 프로그램으로 전처리하여 고품질 데이터를 선별하였다(Chen et al, 2018). BWA 프로그램(ver. 0.7.17)을 사용하여 리드를 참조 유전체에 정렬하였고(Li, 2013), SAMtools (ver. 1.6) 소프트웨어를 이용해 SNP 변이를 탐색하였다(Li et al, 2009).

모든 샘플의 유전 변이 데이터는 GATK CombineGVCF 도구로 통합하였으며(Van der Auwera and O'Connor, 2020), VCF SelectVariants 도구로 고품질 변이만을 선별하였다. 양대립 유전자(bi-allelic)이면서 최소 대립 유전자 빈소(minor allele frequency, MAF)가 0.03 이상, 하디-바인베르크 평형(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) p-value가 1×10^{-3} 이상이며, genotyping rate이 95% 이상인 변이를 VCFtools (ver. 0.1.16) 소프트웨어를 통해 필터링하였다(Danecek et al, 2011). 마지막으로, 선택된 단일 염기 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 간의 연관 불평형(linkage disequilibrium, LD) 분석을 통해 50bp 내 반복 영역이 없고 MAF가 가장 높은 SNP를 우선적으로 선정하였다. 최종적으로, 선택된 SNP에 대해 probe 디자인 효율성을 검증한 후 Affymetrix®의 Axiom® Custom SNP 60K chip을 개발하였다.

4. Genomic DNA extraction, genotyping, and quality control

총 2,585개체의 넙치 꼬리 지느러미 샘플에서 Chelex 100 (Bio-Rad, USA)을 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 꼬리 지느러미 샘플은 5% Chelex 100과 0.02% Protase K (Roche, Swiss)가 포함된 150 μ l 용액에 담가 Thermocycler (Bio-Rad, USA)에서 55°C에서 1시간, 이후 100°C에서 10분간 배양하였다. 추출한 genomic DNA는 4°C에서 보관하였다. 총 2,585개체를 대상으로 Affymetrix® Axiom® myDesign™ Genotyping Array 60K SNP칩을 사용하여 유전자형 분석을 수행하였다. SNP의 품질 관리를 위해 PLINK (ver. 1.9)를 사용하여 MAF가 0.05 미만이거나 유전자형 누락률이 0.1을 초과하는 SNP를 제거하였다(Chang et al, 2015). 최종적으로 58,146개의 염색체상의 SNP 마커가 분석에 사용되었다.

5. Statistical analysis

넙치 집단 내 유전적 구조를 파악하고 집단 구조를 보정하기 위해 주성분 분석(principal component analysis, PCA)를 수행하였으며, 이 과정에서 PLINK (ver. 1.9)를 사용하였다(Chang et al, 2015). 넙치 집단에서 Scuticociliatosis 내병성과 관련된 유전적 좌위를 동정하기 위해 SPACox 소프트웨어를 이용하여 염색체 상의 58,146개의 SNP 마커를 대상으로 GWAS를 수행하였다(Bi et al, 2020). 이 프로그램은 Cox proportional hazard (Cox PH) 모형을 통해 martingale 잔차의 empirical cumulant generating function (CGF)를 추정하고, saddle point approximation (SPA)을 적용하여 p-value를 보정한다. 집단 구조에 의한 혼란 변수(confounder)를 통제하기 위해 26개의 주성분을 공변량으로 포함하였으며, GWAS에 사용된 Cox PH 회귀 모형은 다음과 같다:

$$\lambda(t; X_i, G_i) = \lambda_0(t) \exp(X_i^T \alpha + G_i \beta)$$

여기서 $\lambda(t; X_i, G_i)$ 는 시간 t 에서의 proportional hazard, $\lambda_0(t)$ 는 baseline hazard function, X_i 는 i 번째 개체의 절편과 26개의 주성분을 포함하는 공변량 벡터, G_i 는 대립유전자 개수(0, 1 또는 2)를 나타내며, β 는 변이에 따른 유전적 효과를 나타낸다. 전장 유전체 유의성에 대한 제안적(suggestive) 임계 수준과 유의적(significant) 임계수준은 Bonferroni 보정을 통해 마커 수($n=58,146$) 기준으로 0.05와

0.01을 넘는 값인 8.6×10^{-7} 와 1.72×10^{-7} 로 설정하였다. GWAS 결과 시각화는 R (ver. 4.2.3)의 CMplot 패키지를 활용하였다(Yin et al, 2021). Scuticociliatosis 내병성과 유의적인 관련성을 보이는 SNP들의 효과를 정량화하기 위해 해당 SNP들의 hazard ratio를 추정했다. 생존 데이터를 분석하여 Kaplan-Meier 생존 곡선을 작성하였으며, 95% 신뢰구간을 포함한 hazard ratio를 추정하였다. Cox PH 회귀 분석은 27개의 주성분을 공변량으로 지정하여 수행하였으며, 이 분석은 SAS/STAT® (ver. 9.4) 소프트웨어를 사용하여 진행되었다 (Statistical Analysis Software User's Guide Version 9.4. Cary, NC SAS Institute, Inc.).

6. Positional candidate gene identification and biological pathway analysis

Scuticociliatosis 내병성에 통계적으로 전장 유전체수준에서 유의적(suggestive, significant)으로 영향을 미치는 SNP 마커의 위치를 기준으로, 해당 SNP에 가장 인접한 유전자를 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)을 활용하여 위치 후보 유전자로 지정하였다.

전장 유전체 유의성 임계 수준에는 미치지 않지만, 표현형 변이에 영향을 줄 가능성이 있는의 마커($p < 0.05$)들을 기준으로 $\pm 1.5\text{kb}$ 내에 위치한 유전자들의 생물학적 경로는 Enrichr 데이터베이스의 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 라이브러리를 통해 분석하였다(Kanehisa and Goto, 2000; Xie et al, 2021).

RESULTS AND DISCUSSION

1. Phenotyping and genotyping

부 70 마리, 모 68 마리로부터 생산된 2,585마리의 넙치를 Scuticociliate에 감염시켜 13일 동안 누적 폐사 그래프 (Fig 1A) 및 Kaplan-Meier 그래프 (Fig 1B) 분석 결과, Scuticociliate 인위 감염후 4-6일 사이에 급격한 폐사가 발생하여 생존율이 약 75%로 감소하였다. 이어서 6-8일 사이에 다시 한번 큰 폐사가 관찰되어 인위감염 9일경에는 생존율이 약 50%까지 떨어졌다. 이후, 완만한 감소세를 보이다가 실험 종료 시점인 16일째에는 최종적으로 33.1%의 생존율을 나타냈으며 ($n=2,585$, 생존개체 수=855), 중앙생존기간(median survival time)은 약 8일이었다.

유전자형 분석을 통해 넙치 2,585개체에서 총 59,447개의 염색체 SNP 마커를 확보하였다. 이 중 유전자형 누락률 기준을 초과한 569개의 변이와 MAF 기준에 미달한 732개의 변이가 제거되었으며, 최종적으로 2,585마리의 넙치에게서 58,146개의 SNP 마커가 분석에 사용되었다.

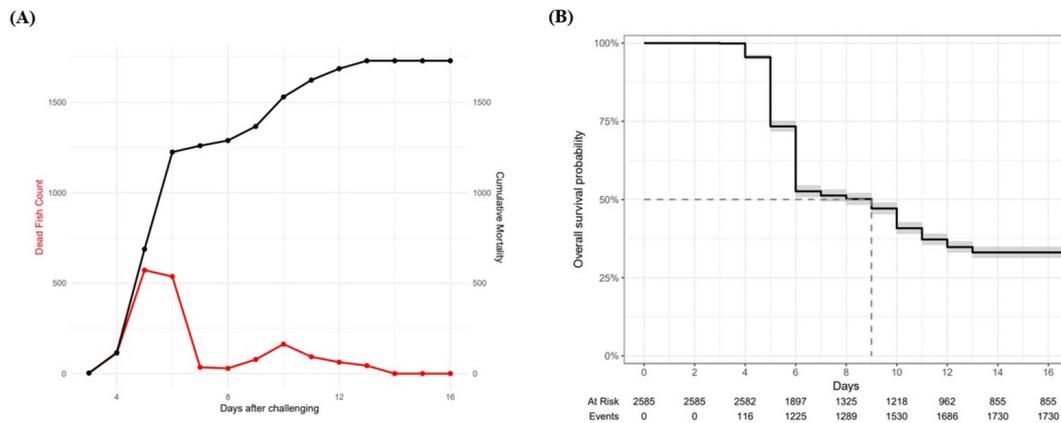


Figure 1. (A) Cumulative mortality rate (black) and number of dead fish (red) during the Scuticociliate challenge experiment, and (B) Kaplan-Meier survival curve showing overall survival probability during the Scuticociliate challenge.

2. Genome-wide association study

GWAS에서 공변량으로 사용할 주성분(principal component, PC) 값을 산출하기 위해 우선 PCA를 수행하였다. 상위 26개의 PC 값은 집단 내 유전 구조의 94.47%를 설명하였으며, 상위 26개의 PC 값을 GWAS를 위한 통계모형에 포함하여 코호트 내 존재하는 집단의 구조로 발생 할 수 있는 편향을 보정하였다.

SPACox 프로그램을 사용한 GWAS 분석 수행 결과, 8개의 염색체에서 총 21개의 SNP 마커가 Scuticociliatosis 내병성과 관련성을 보이는 것을 검출하였다(Fig. 2, Table 1). 각 각의 동정된 질병 유전자 내병성 유전자 좌위 영역 내에서 p-value가 가장 낮은 SNP를 Top SNP으로 지정하였고, 해당 Top SNP의 유전자형 별 생존 곡선은 Fig. 3에 나타내었다.

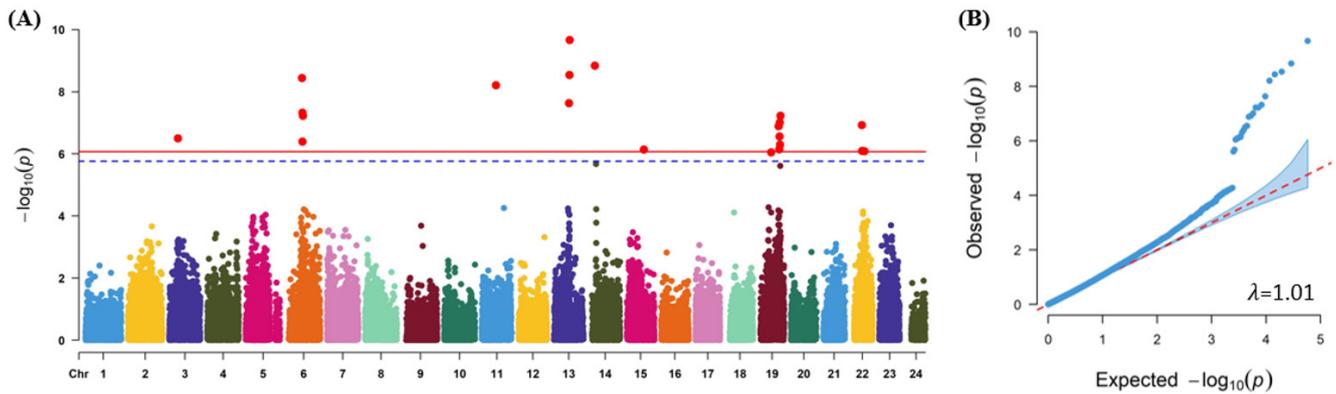


Figure 2. (A) Manhattan plot and (B) quantile-quantile plot from genome-wide association study for Scuticociliatosis resistance of olive flounders. The red solid line and the blue dashed line in the Manhattan plot represent the significant threshold and suggestive threshold, respectively.

Table 1. Description of significantly associated SNPs for Scuticociliatosis resistance in the GWAS

CHR	¹ NSNP	Interval (Mb)	² Top SNP	Position (bp)	p-value	³ HR (95% CI)	⁴ Gene
3	1	7.40	AX-683100976	7,404,014	3.17×10^{-7}	1.31 (1.16-1.48)	<i>NEK7</i>
6	4	12.82-13.68	AX-683093077	12,818,673	3.76×10^{-9}	1.36 (1.20-1.53)	<i>ZNF362B</i>
11	1	12.12	AX-683128119	12,119,884	6.37×10^{-9}	1.36 (1.21-1.52)	<i>LOC109642188</i>
13	3	12.87-13.42	AX-671321500	13,424,111	2.23×10^{-10}	1.57 (1.27-1.94)	<i>PTPRUB</i>
14	1	3.95	AX-683134521	3,946,999	1.22×10^{-9}	1.47 (1.27-1.69)	<i>COL13A1</i>
15	1	14.42	AX-419279251	14,416,691	7.40×10^{-7}	1.35 (1.18-1.55)	<i>RBI</i>
19	7	9.56-17.71	AX-683149633	17,708,707	5.96×10^{-8}	1.31 (1.06-1.62)	<i>DPYSL5</i>
22	3	8.65-10.82	AX-671539182	8,654,946	1.20×10^{-7}	1.25 (1.11-1.42)	<i>PC</i>

¹ The number of significant or suggestive SNPs for each QTL region, ² The name of SNP which has lowest p-value for each QTL region, ³ Hazard ratio (95% confidence interval) of the Top SNP, ⁴ nearest gene to the Top SNP

염색체 3번에 위치한 AX-683100976과 가까운 *NEK7* 유전자는 칼륨 이온 유출 후 NLRP3 염증성 복합체 활성화에 필수적인 단백질질을 암호화한다. 이는 염증 반응에서 중요한 역할을 하는 매개체로 알려져 있다(He et al, 2016). NLRP3 염증성 복합체는 병원체의 침입을 감지하여 특정 원생 동물에 대한 염증 반응을 유도하는 역할을 한다(Mortimer et al, 2015). 이러한 점을 바탕으로 *NEK7*이 Scuticociliatosis 내병성에 관여할 가능성이 있다고 판단된다.

염색체 6번에서 동정된 AX-683093077은 *ZNF362B* 유전자 내에 위치하며, *ZNF362B*는 zinc finger 단백질 계열에 속한다. Zinc finger 단백질은 세포 발달, 분화, 면역 반응 조절 등 다양한 생물학적 과정에서 중요한 역할을 한다. 그러나 *ZNF362B*의 구체적인 기

능이나 면역 반응과의 관계는 아직 밝혀지지 않았다. 따라서 Scuticociliatosis와 같은 감염성 질환에서 ZNF362B의 역할을 규명하기 위한 추가 연구가 필요하다고 사료된다.

염색체 13번에 위치한 AX-671321500은 *PTPRUb* 유전자 내에 위치하며, 이는 *PTPRU* 유전자의 변형된 형태로, 세포 신호 전달 및 세포 접착과 이동 조절에 관여한다고 알려져 있다(Zhu et al, 2014). 이러한 기능은 감염 초기에 면역세포가 염증 부위로 이동하는 과정이나 병원체에 대한 면역 반응을 조절하는 데 중요한 역할을 할 수 있다. 그러나 *PTPRU*와 면역 반응 간의 구체적인 관계는 아직 명확히 밝혀지지 않았으므로 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

염색체 14번에 위치한 AX-683134521은 *COL13A1* 유전자 내에 있으며, *COL13A1*은 세포막에 존재하는 막관통형 콜라겐 XIII을 암호화한다. 콜라겐 XIII은 세포 간 결합과 조직 무결성 유지에 중요한 역할을 한다(Peltonen et al, 1999; Hägg et al, 2001). Scuticociliatosis와 같은 원생 동물 감염에서는 세포 구조의 안정성과 염증 반응에 대한 숙주의 내병성이 감염의 심각성에 영향을 미칠 수 있기 때문에, *COL13A1*의 기능이 이러한 방어 기전에 기여할 가능성이 있다고 판단된다. *COL13A1*과 Scuticociliatosis 내병성 간의 구체적인 메커니즘을 규명하기 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

염색체 15번에서 동정된 AX-419279251은 *RB1* 유전자 내에 위치해 있으며, *RB1*은 종양 억제 유전자로 세포 주기 조절과 세포 증식을 억제하는 데 중요한 역할을 한다(Goodrich et al, 1991). 이러한 기능은 감염성 질환에 대한 내병성에도 기여할 수 있다. 예를 들어, *RB1*이 정상적으로 기능할 경우 면역세포가 병원체에 대응하는 과정에서 세포 주기가 적절히 조절되고 불필요한 염증 반응이 억제될 가능성이 있다. 하지만 *RB1*과 Scuticociliatosis 내병성 간의 직접적인 연관성은 아직 밝혀지지 않아 추가 연구가 필요하다고 판단된다.

염색체 19번에 위치한 AX-683149633은 *DPYSL5* 유전자 내에 있으며, *DPYSL5*는 세포골격 재구성과 신경 발달에서 중요한 역할을 하며, 세포 이동과 구조 유지에 기여하는 단백질로 알려져 있다(Desprez et al, 2023). 비록 *DPYSL5*와 Scuticociliatosis 내병성 간의 직접적인 연관성은 아직 밝혀지지 않았지만, 면역세포의 이동을 돕고 감염에 의해 손상된 조직의 복구 과정에 기여할 가능성이 있다.

염색체 22번에 위치한 AX-671539182는 *PC* 유전자 내에 위치해 있으며, *PC* 유전자는 세포의 에너지 대사, 특히 포도당 신생합성 및 TCA 회로를 통한 ATP 생성에 중요한 역할을 한다(Wallace et al, 1998). 감염성 질환에서는 면역세포가 병원체에 대응하기 위해 많은 에너지를 필요로 하므로, *PC*가 면역 반응 중 에너지 대사를 조절하는 기능을 수행할 가능성이 있다. 또한 감염 후 조직 회복 과정에서도 *PC*가 충분한 에너지를 공급하여 조직 재생을 지원할 수 있다. 그러나 *PC*와 Scuticociliatosis 내병성 간의 직접적인 연관성은 아직 밝혀지지 않아 향후 연구를 통한 규명이 필요하다고 생각된다.

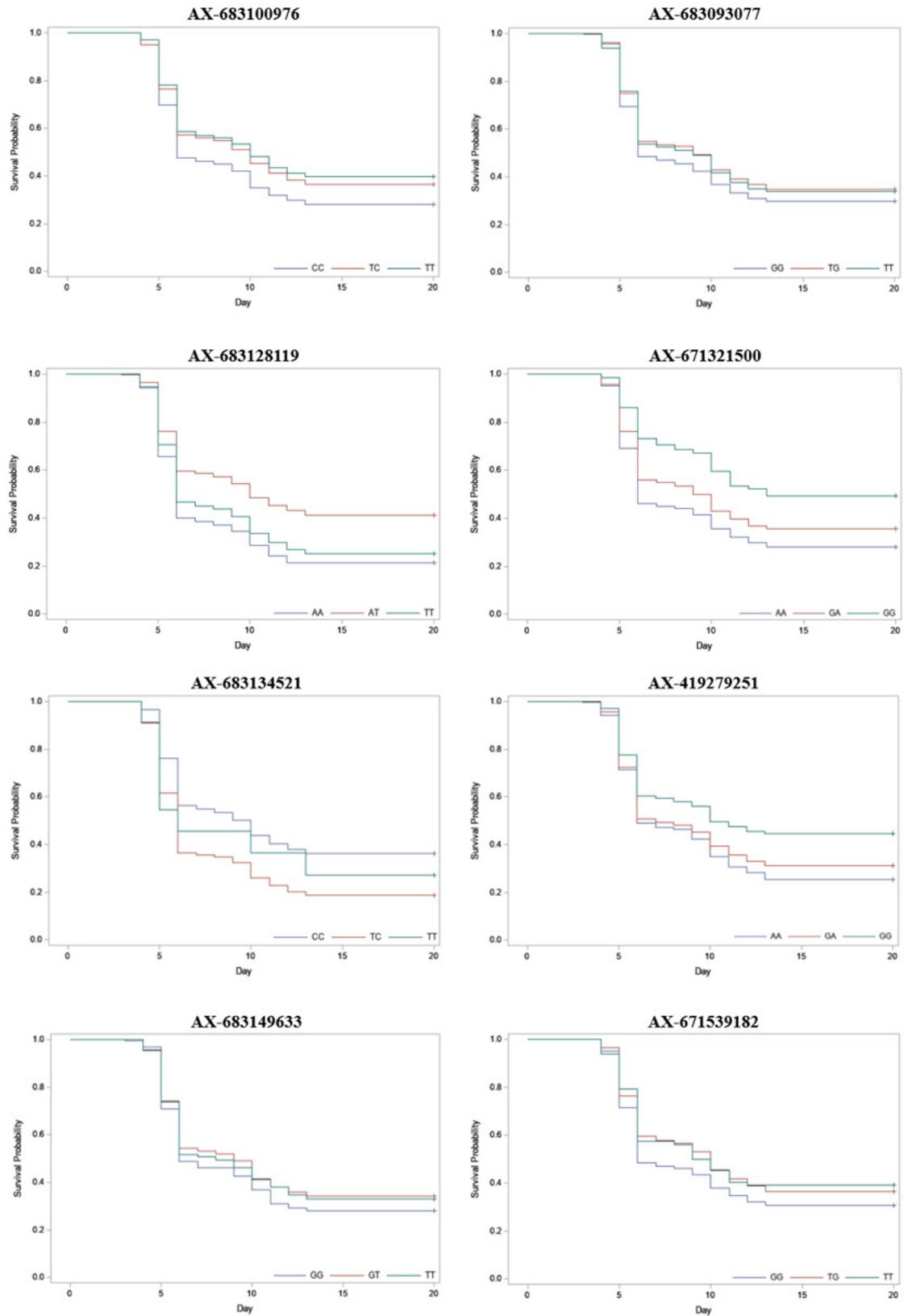


Figure 1. Survival curve plots for Scuticociliatosis of the TopSNPs.

Scuticociliatosis 내병성에 영향을 줄 수 있는 위치 후보 유전자들의 분자적 기전을 탐구하기 위해 생물학적 경로 분석을 수행하였다. GWAS 분석에서 nominal p-value가 0.05 미만인 SNP는 총 3,719개였으며, 이들 SNP의 $\pm 1.5\text{kb}$ 내에 위치한 유전자는 1,359개로 확인되었다. 1,359개 유전자를 대상으로 KEGG 경로 분석을 실시한 결과, nominal p-value가 0.01 미만인 생물학적 경로가 7개 도출되었다(Table 2). 7개의 유의한 생물학적 경로 중 면역 작용과 관련된 경로들이 다수 식별되었으며, 이에 Focal adhesion, ECM-receptor interaction, Inositol phosphate metabolism, Platelet activation, Rap1 signaling pathway이 있다.

Focal adhesion은 세포와 세포의 기질(extracellular matrix, ECM) 사이의 상호작용을 통해 세포 부착과 이동을 조절하고, 다양한 세포 반응을 지원하는 역할을 한다. 특히, Focal adhesion은 면역 세포가 병원균에 반응해 감염된 조직으로 이동하는 과정에서 중요한 역할을 하며, 세포의 신호 전달을 통해 감염 과정에서의 염증 반응, 조직 복구 및 재생 같은 다양한 생리적 반응에도 관여한다(Hauk et al, 2000). 이는 Scuticociliatosis 감염 시, Focal adhesion이 면역 세포의 이동과 활성화를 조절하여 감염 내병성에 영향을 줄 가능성을 시사한다. ECM-receptor interaction은 Focal adhesion과 기능적으로 유사한 부분이 많은 생물학적 경로로, 세포와 ECM 간의 상호작용을 조절하고, 이를 통해 세포 부착, 이동, 신호 전달 등의 중요한 생물학적 과정을 지원한다. 특히, ECM-receptor interaction은 병원균이 숙주 세포에 부착하고 감염을 확산하는 데 중요한 기전으로 기능한다. 또한 ECM 리모델링은 병원균의 침입을 막거나 촉진하는 중요한 요인으로, 감염에 대한 내병성을 높이는 데 기여할 수 있다(Vaca et al, 2020; Pfisterer et al, 2021). Inositol phosphate는 세포 내 신호 전달과 칼슘 이온 조절에 중요한 역할을 하며, 이는 면역 세포 활성화와 염증 반응에 필수적이다(Miller et al, 2015). 이 경로는 Scuticociliatosis에 대한 숙주의 방어 기전을 조절할 수 있는 칼슘 신호 전달 경로에 영향을 줄 수 있으며, 이를 통해 병원체의 감염을 억제할 수 있다. Platelet activation은 혈소판의 활성화와 관련된 다양한 생리적 과정을 조절한다. 혈소판은 일반적으로 혈액 응고에 관여하지만, 면역 반응 및 염증 반응에서도 중요한 역할을 한다. 감염 상황에서 혈소판은 면역세포와 상호작용하여 감염 부위의 면역세포 이동을 촉진하고, 염증 반응을 조절하는 데 기여할 수 있다(Morrell et al, 2014). Scuticociliatosis 감염 시, Platelet activation 경로의 활성화는 감염 부위에서의 면역 방어 강화에 기여할 가능성이 있으며, 이는 숙주의 감염 내병성에 긍정적인 영향을 미칠 수 있다. Rap1 signaling pathway는 세포의 부착과 이동을 조절하며, 특히 면역 세포가 감염 부위로 이동하고 활성화되는 과정에서 중요한 역할을 한다. Scuticociliatosis 감염 시, 면역 세포가 병원체에 신속하게 반응하고 감염 부위로 이동하는 것이 감염 내병성의 중요한 요소 중 하나이다. Rap1 signaling pathway의 활성화는 이러한 면역 세포의 이동을 촉진하고 염증 반응을 조절함으로써 감염 내병성을 높일 수 있다. 따라서 본 연구는 여러 신호 전달 경로와 분자적 메커니즘들이 Scuticociliatosis 내병성 형성에 중요한 역할을 한다는 것을 시사하며, 향후 이러한 경로를 표적으로 한 연구가 Scuticociliatosis 내병성 증진에 기여할 수 있을 것이다.

Table 2. Significant pathways for the positional candidate genes located within 1.5kb of SNPs with *p*-value < 0.05

Term	¹ p-value	Genes
Focal adhesion	<0.001	<i>ITGB1, SRC, ITGB3, PTEN, PIK3CD, PIK3R1, EGFR, PAK4, PAK5, VAV3, ITGA3 et al.</i>
Axon guidance	<0.01	<i>SEMA5A, SEMA5B, SEMA3C, SEMA3G, EPHA5, RYK, GNAI3, PIK3CD, PIK3R1, PRKCA et al.</i>
ECM-receptor interaction	<0.01	<i>ITGB1, VWF, LAMA2, ITGA3, LAMB2, ITGB3, LAMB1, HSPG2, ITGA10, ITGA8, ITGA5 et al.</i>
Inositol phosphate metabolism	<0.01	<i>IPPK, FIG4, INPP4B, PLCB1, PLCB3, PLCB4, INPP5F, PTEN, PI4KA, PIK3CD, PIK3CG et al.</i>
Platelet activation	<0.01	<i>ITGB1, VWF, SRC, ITGB3, GNAI3, PIK3CD, PIK3R1, PIK3CG, PLCB3, PLCB4, PLCB1 et al.</i>
Rap1 signaling pathway	<0.01	<i>ITGB1, DOCK4, SRC, ITGB3, GNAI3, PIK3CD, PIK3R1, EGFR, VAV3, PRKCA, VEGFA et al.</i>
Spinocerebella ataxia	<0.01	<i>GRIA2, GRM1, GRIN2A, PIK3CD, PRKCA, PIK3R1, ITPR3, PLCB1, RLEN, ATXN10 et al.</i>

CONCLUSION

본 연구는 넙치 집단에서 Scuticociliatosis에 대한 유전적 내병성을 분석하여, 내병성 관련 유전자를 확인하고 이들이 포함된 생물학적 경로를 탐색하였다. GWAS를 통해 3번, 6번, 11번, 13번, 14번, 15번, 19번, 22번 염색체에서 총 8개의 QTL을 동정하였으며, 이들 QTL의 위치 후보 유전자들이 염증 반응, 세포 접착 및 이동, 면역 조절에 기여하는 것으로 나타났다. 그러나 위치 후보 유전자와 Scuticociliatosis 사이의 구체적인 메커니즘은 밝혀진 바 없으므로 규명을 위한 연구가 필요하다고 사료되며, 이를 통해 향후 어류 육종 프로그램에서 질병 내병성 증대를 위한 유전적 자원으로 활용될 수 있을 것이다.

생물학적 경로 분석 결과, Focal adhesion, ECM-receptor interaction, Inositol phosphate metabolism, Platelet activation, Rap1 signaling pathway 등 여러 경로가 Scuticociliatosis 감염 내병성과 관련이 있는 것으로 나타났다. 이 경로들은 세포 접착 및 이동, 염증 반응 조절, 신호 전달, 면역 세포의 활성화 등 감염에 대한 숙주의 방어 기전에 기여하는 역할을 한다.

본 연구는 Scuticociliatosis 감염에 대한 유전적 내병성을 심층적으로 분석하여, 질병 내병성에 관여하는 유전적 요소와 이들이 포함된 분자적 기전을 밝혀냄으로써, 넙치 양식업에서 질병 관리에 필요한 육종 전략을 수립하는 데 기여할 수 있을 것이다. 아울러, 본 연구에서 확인된 유전자 및 경로들을 바탕으로 한 후속 연구는 Scuticociliatosis에 대한 내병성을 더욱 정확히 이해하고 이를 강화하는 데 중요한 역할을 할 것이다.

ACKNOWLEDGEMENTS

이 논문은 국립수산물품질관리원(수산물품질관리사업 R2024032)의 지원으로 수행되었습니다.

REFERENCES

- Bi W., Fritsche L. G., Mukherjee B., Kim S. and Lee S. 2020. A Fast and Accurate Method for Genome-Wide Time-to-Event Data Analysis and Its Application to UK Biobank. *The American Journal of Human Genetics*. 107(2):222–233.
- Chang C. C., Chow C. C., Tellier L. C., Vattikuti S., Purcell S. M. and Lee J. J. 2015. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *Gigascience*. 4(1):s13742–8.
- Chen Y., Chen Y., Shi C., Huang Z., Zhang Y., Li S., Li Y., Ye J., Yu C. and Li Z. 2018. SOAPnuke: a MapReduce acceleration-supported software for integrated quality control and preprocessing of high-throughput sequencing data. *Gigascience*. 7(1):gix120.
- Danecek P., Auton A., Abecasis G., Albers C. A., Banks E., DePristo M. A., Handsaker R. E., Lunter G., Marth G. T. and Sherry S. T. 2011. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*. 27(15):2156–2158.
- Desprez F., Ung D. C., Vourc'h P., Jeanne M. and Laumonier F. 2023. Contribution of the dihydropyrimidinase-like proteins family in synaptic physiology and in neurodevelopmental disorders. *Frontiers in Neuroscience*. 17:1154446.
- Goodrich D. W., Wang N. P., Qian Y., Eva Y. L. and Lee W. 1991. The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. *Cell*. 67(2):293–302.
- Hägg P., Väisänen T., Tuomisto A., Rehn M., Tu H., Huhtala P., Eskelinen S. and Pihlajaniemi T. 2001. Type XIII collagen: a novel cell adhesion component present in a range of cell–matrix adhesions and in the intercalated discs between cardiac muscle cells. *Matrix Biology*. 19(8):727–742.
- Harikrishnan R., Jin C., Kim J., Balasundaram C. and Heo M. 2012. Philasterides dicentrarchi, a histophagous ciliate causing scuticociliatosis in olive flounder, *Philasterides dicentrarchi*–Histopathology investigations. *Exp.Parasitol*. 130(3):239–245.
- Hauck C. R., Klingbeil C. K. and Schlaepfer D. D. 2000. Focal adhesion kinase functions as a receptor-proximal signaling component required for directed cell migration. *Immunol.Res*. 21:293–303.
- He Y., Zeng M. Y., Yang D., Motro B. and Núñez G. 2016. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature*. 530(7590):354–357.

- Hughey J. J., Rhoades S. D., Fu D. Y., Bastarache L., Denny J. C. and Chen Q. 2019. Cox regression increases power to detect genotype-phenotype associations in genomic studies using the electronic health record. *BMC Genomics*. 20:1–7.
- Iglesias R., Paramá A., Alvarez M. F., Leiro J., Fernández J. and Sanmartín M. L. 2001. *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida) as the causative agent of scuticociliatosis in farmed turbot *Scophthalmus maximus* in Galicia (NW Spain). *Dis.Aquat.Org.* 46(1):47–55.
- Kanehisa M. and Goto S. 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 28(1):27–30.
- Kim N. L., Kim H. S., Kim D. H., Lee N. S., Kim S. K. and Min B. H. 2023. Value Chain Analysis of the Olive Flounder *Paralichthys olivaceus* Aquaculture Industry. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 56(6):930–935.
- Kim W., Kim S., Kim D., Kim J., Park M., Kitamura S., Kim H., Kim D., Han H., Jung S. and Oh M. 2009. An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea. *Aquaculture*. 296(1):165–168.
- Lee J., Choi I. C., Kim K. T., Cho S. H. and Yoo J. Y. 2012. Response of dietary substitution of fishmeal with various protein sources on growth, body composition and blood chemistry of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*, Temminck & Schlegel, 1846). *Fish Physiol.Biochem.* 38(3):735–744.
- Li H. 2013. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. arXiv preprint arXiv:1303.3997.
- Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R. and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. 2009. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 25(16):2078–2079.
- Miller A. T., Dahlberg C., Sandberg M. L., Wen B. G., Beisner D. R., Hoerter J. A., Parker A., Schmedt C., Stinson M. and Avis J. 2015. Inhibition of the inositol kinase *Itpkb* augments calcium signaling in lymphocytes and reveals a novel strategy to treat autoimmune disease. *PLoS One*. 10(6):e0131071.
- Morrell C. N., Aggrey A. A., Chapman L. M. and Modjeski K. L. 2014. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 123(18):2759–2767.
- Mortimer L., Moreau F., Cornick S. and Chadee K. 2015. The NLRP3 inflammasome is a pathogen sensor for invasive *Entamoeba histolytica* via activation of $\alpha 5\beta 1$ integrin at the macrophage-amebae intercellular junction. *PLoS pathogens*. 11(5):e1004887.
- Moustafa E. M. M., Tange N., Shimada A. and Morita T. 2010. Experimental scuticociliatosis in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) infected with *Miamiensis avidus*: pathological study on the possible neural routes of invasion and dissemination of the scuticociliate inside the fish body. *Journal of Veterinary Medical Science*. 72(12):1557–1563.
- Peltonen S., Hentula M., Hägg P., Ylä-Outinen H., Tuukkanen J., Lakkakorpi J., Rehn M., Pihlajaniemi T. and Peltonen J. 1999. A novel component of epidermal cell–matrix and cell–cell contacts: transmembrane protein type XIII collagen. *J.Invest.Dermatol.* 113(4):635–642.
- Pfisterer K., Shaw L. E., Symmank D. and Weninger W. 2021. The extracellular matrix in skin inflammation and infection. *Frontiers in cell and developmental biology*. 9:682414.
- Tsai H., Hamilton A., Tinch A. E., Guy D. R., Bron J. E., Taggart J. B., Gharbi K., Stear M., Matika O. and Pong-Wong R. 2016. Genomic prediction of host resistance to sea lice in farmed Atlantic salmon populations. *Genetics Selection Evolution*. 48:1–11.
- Turgay E., Steinum T. M., Gül A. E. and Karataş S. 2015. An outbreak of scuticociliatosis in cultured common dentex (*Dentex dentex*) in Turkey. *Bull.Eur.Assoc.Fish Pathol.* 35(3):104–111.
- Uffelmann E., Huang Q. Q., Munung N. S., De Vries J., Okada Y., Martin A. R., Martin H. C., Lappalainen T. and Posthuma D. 2021. Genome-wide association studies. *Nature Reviews Methods Primers*. 1(1):59.
- Vaca D. J., Thibau A., Schütz M., Kraiczky P., Happonen L., Malmström J. and Kempf V. A. 2020. Interaction with the host: the role of fibronectin and extracellular matrix proteins in the adhesion of Gram-negative bacteria. *Med.Microbiol.Immunol.(Berl.)*. 209(3):277–299.
- Van der Auwera G. A. and O'Connor B. D. 2020. Genomics in the cloud: using Docker, GATK, and WDL in Terra.
- Wallace J. C., Jitrapakdee S. and Chapman-Smith A. 1998. Pyruvate carboxylase. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 30(1):1–5.
- Xie Z., Bailey A., Kuleshov M. V., Clarke D. J., Evangelista J. E., Jenkins S. L., Lachmann A., Wojciechowicz M. L., Kropiwnicki E. and Jagodnik K. M. 2021. Gene set knowledge discovery with Enrichr. *Current protocols*. 1(3):e90.
- Yin L., Zhang H., Tang Z., Xu J., Yin D., Zhang Z., Yuan X., Zhu M., Zhao S., Li X. and Liu X. 2021. rMVP: A Memory-efficient, Visualization-enhanced, and Parallel-accelerated Tool for Genome-wide Association Study. *Genomics, proteomics & bioinformatics*. 19(4):619–628.
- Yoshida G. M., Bangera R., Carvalheiro R., Correa K., Figueroa R., Lhorente J. P. and Yáñez J. M. 2018. Genomic prediction accuracy for resistance against *Piscirickettsia salmonis* in farmed rainbow trout. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 8(2):719–726.
- Zhu Z., Liu Y., Li K., Liu J., Wang H., Sun B., Xiong Z., Jiang H., Zheng J. and Hu Z. 2014. Protein tyrosine phosphatase receptor U (PTPRU) is required for glioma growth and motility. *Carcinogenesis*. 35(8):1901–1910.