

Research Article

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

Yuju Lee^{1†}, Dain Lee^{2†}, Julan Kim², Tae-Hee Kim¹, Chaehyeon Lim², Hyejin Kim², Jong-Won Park², Yoonji Chung³, Yeongkuk Kim⁴, Min Sung Kim⁵, Seung Hwan Lee³, Woo-jai Lee⁵, Hyun-Chul Kim^{2*}, Hee-Bok Park^{1*}

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

†These authors contributed equally to this work.

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

ABSTRACT

The olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) is one of the most economically important fish species in South Korea's aquaculture industry. However, Edwardsiellosis, caused by *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*), poses a significant threat to this industry, resulting in high mortality rates and economic losses. The aim of this study is to identify genetic loci associated with Edwardsiellosis resistance in olive flounder using a genome-wide association study (GWAS). A challenge experiment was conducted, infecting 2,939 flounders with *E. tarda* and recording survival traits. Genotyping was performed using a 60K SNP array, followed by statistical genetic analysis using SPACox software, which identified four significant SNPs on chromosomes 10, 13, 18, and 21. These SNPs were located in or near positional candidate genes for inflammation and immune responses, such as *STXBP5L*, *MEF2D*, and *HOMER1*, indicating their potential involvement in bacterial defense mechanisms. Biological pathway analysis revealed several significant pathways, including Apelin signaling, ECM-receptor interaction, Calcium signaling, and PI3K-Akt signaling, which are known to regulate immune cell activity and inflammation. These findings provide important insights into the genetic mechanisms of disease resistance in olive flounder and offer valuable resources for future selective breeding programs aimed at enhancing Edwardsiellosis resistance.

Keywords: Disease, Edwardsiellosis, Genome-wide association study, Olive flounder, SNP

INTRODUCTION

2023년 국내 어업 생산량은 2010년 대비 18.25% 증가하여 3,678,417톤에 달했다. 같은 해 국내 어업 생산량 중 연근해어업 생산량은 2010년보다 15.59% 감소한 반면, 해면양식업 생산량은 67.48% 증가하여 2,269,357톤을 기록하였으며, 이를 통해 양식업의 식량 자원으로써의 중요성이 더욱 부각되고 있음을 알 수 있다(KOSIS, 2023). 넙치는 우리나라에서 가장 많이 양식되고 있는 어종으로, 2010년 이후 양식어류 생산량의 약 절반을 차지하는 높은 생산량을 기록하고 있다. 하지만 넙치 양식 산업에서 어분 사료에 대한 높은 의존성, 고비용-저효율의 생산 구조, 전염성 질병 등은 넙치 양식의 지속 가능성에 대한 주요 문제로 여겨지고 있다(Lee et al, 2012; Kim, N. L. et al, 2023; Kim, W. et al, 2009).

Received October 28, 2024

Revised December 09, 2024

Accepted December 09, 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.

에드워드병은 국내 넙치 양식업에서 큰 경제적 손실을 초래하는 주요 전염성 질병 중 하나로 *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*)에 의해 발생한다. 1965년에 처음 명명된 *E. tarda*는 다양한 어종에서 심각한 질병을 일으켜 높은 사망률을 초래하며(Ewing et al, 1965; Vishnupriya et al, 2024; Preena et al, 2022; Liu et al, 2016), 어류뿐만 아니라 양서류, 파충류, 조류, 인간을 포함한 포유류에 감염될 수 있다(Mohanty and Sahoo, 2007; Park et al, 2012). 특히, 최근 항생제의 장기 사용으로 인해 *E. tarda*의 다제 내성 균주가 증가하고 있으며(Sommerset et al, 2005), 클로람페니콜, 테트라사이클린, 스트렙토마이신 등의 여러 종류의 항생제에 내성을 보이는 사례가 보고되고 있다(Wang et al, 2009; Sun et al, 2009; Xiao et al, 2008). 이러한 항생제 문제는 기존 치료 방법의 효능을 저하시켜 폐사를 유발하며, 이는 넙치 양식업에 심각한 경제적 피해로 이어진다.

어류의 질병 내병성을 향상시키기 위한 육종 및 개량 프로그램은 전염병으로 인한 폐사를 막고 경제적 손실을 줄이는 데 중요한 요소로 점점 더 주목받고 있다. 최근에는 특정 질병에 대한 내병성을 강화하기 위해 유전체 마커 정보를 활용한 육종 프로그램이 도입되면서, 선발 정확도와 육종가 예측의 신뢰성이 향상되고 있다(Tsai et al, 2016; Yoshida et al, 2018). 유전체 선발(genomic selection)과 마커 도움 선발(marker-assisted selection)을 수행하기 위해서는 먼저 전장 유전체 관련성 분석(genome-wide association study, GWAS)을 통해 형질 변이와 관련성을 보이는 유전적 변이를 동정해야 한다. 일반적으로 형질이 이진형(예: 폐사 또는 생존)일 경우 GWAS에서는 로지스틱 회귀 모델이 활용된다(Uffelmann et al, 2021). 그러나 로지스틱 회귀 모델은 추적 기간이나 사건 발생 시점을 충분히 반영하지 못하는 한계가 있다. 이러한 time-to-event 표현형 분석을 위해 Cox 비례위험 회귀(Cox proportional hazards regression)가 사용될 수 있으며, 이러한 형질에 대한 보다 정밀한 관련성 분석이 가능하다. 또한, Cox 회귀는 로지스틱 회귀에 비해 동일한 제1종 오류 수준에서 더 높은 통계적 검정력(statistical power)을 제공한다(Hughey et al, 2019).

따라서, 본 연구는 넙치 집단에서 에드워드병에 대한 내병성을 대상으로 GWAS를 수행하여 양적 형질 좌위(quantitative trait locus, QTL)를 식별하고, 이들 영역 내에서 후보 원인 유전자를 탐색하는 것을 목적으로 수행되었다. 아울러, 후보 원인 유전자들의 생물학적 경로 분석도 함께 진행되었다.

MATERIALS AND METHODS

1. 공시동물 정보

넙치 집단(F7)은 2021년 4월 14일 국립수산과학원 육종연구센터에서 48개체의 수컷과 49개체의 암컷을 교배하여 생산하였다. 부모 개체와 본 연구에 사용된 넙치 개체들 간의 친자 관계는 10개의 microsatellite 마커를 이용해 유전자형을 분석한 후, 이를 이용하여 가계분석을 실시하였다. 생산된 넙치 집단(F7)은 자연광 주기하에서 18°C의 3톤 순환 수조에서 사육되었다. 자어는 부화 후 3일부터 23일까지 L형 로티퍼를 급여하였으며, 부화 후 13일부터 30일까지는 치어사료인 아르테미아(*artemia*)를 급여하였다. 또한, 부화 후 17일부터는 펠릿 사료의 급여량을 점진적으로 늘려 급여하였다. 에드워드병 실험에 사용된 개체는 무작위로 선발되었으며, 선발 전 모든 개체의 건강 상태는 국립수산과학원의 수산생물 질병진단 지침에 따라 검토되었다. 세균성 질병원인균(에드워드, 연쇄구균, 비브리오)과 바이러스성 질병원인균(VHSV)은 PCR 검사를 통해 감염 여부를 확인하였으며, 스크티카 감염 여부는 현미경 관찰을 통해 확인하였고, 활주세균증 여부는 육안으로 관찰하였다.

2. *Edwardsiella tarda* challenge experiment and phenotype collection

에드워드병 실험을 위해 임의로 선택된 개체들은 수온이 23 ± 0.5°C로 유지된 1톤 원형 수조로 옮겨져 실험에 이용되었다. 실험은 2022년 8월 12일에 시작되었으며, 각 개체에 1 × 10⁶ CFU의 *E. tarda*를 복강주사하였다. 이후 실험은 2022년 8월 26일까지 진행되었고, 주사 후 매일 오전 9시와 오후 5시에 개체의 상태를 관찰하고 샘플을 채취하였다. 실험 동안 광주기는 15시간, 암주기는 9시간으로 설정되었으며, 수질 관리는 하루 8.6회 회전수를 유지하여 이루어졌다. 인위 감염 후 *E. tarda* 감염 여부는 PCR 검사와 육안 관찰을 통해 확인되었다. 에드워드병 내병성에 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 2 일 동안 생존한 경우, DTD 값은 2로 기록되었다. DTD 값은 실험 기간 동안 19일까지 기록되었으며, 실험이 종료된 시점까지 생존한 개체들은 이후의 생존 여부에 대한 추가 정보를 가지지 않기 때문에 right-censored 데이터로 처리되었다.

3. Development of the 60K SNP array

100마리의 넙치에서 추출한 genomic DNA를 이용하여 TruSeq DNA PCR-Free Kit (Illumina, USA)를 사용해 시퀀싱 라이브러리를 제작하였다. 이후 Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, USA) 플랫폼을 통해 pair-end 모드로 전장 유전체 시퀀싱(whole-genome sequencing, WGS)을 진행하였다. 시퀀싱된 원시 데이터는 SOAPnuke 프로그램을 통해 전처리하여 고품질 데이터를 선별하였다 (Chen et al, 2018). BWA 프로그램 version 0.7.17을 사용하여 참조 유전체에 리드를 정렬하였고(Li, 2013), 이후 SAMtools version 1.6 소프트웨어를 이용해 SNP 변이를 탐색하였다(Li et al, 2009). GATK CombineGVCF 도구를 사용하여 모든 샘플의 유전 변이 데이터를 통합하였으며(Van der Auwera and O'Connor, 2020), VCF SelectVariants 도구를 통해 주요 고품질 변이만을 선별하였다. 이 과정에서 양대립 유전자(bi-allelic)이고 최소 대립 유전자 빈도(minor allele frequency, MAF)가 0.03 이상인 변이, 하디-바인베르크 평형(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) p-value가 1×10^{-3} 이상인 변이, genotyping rate이 95% 이상인 변이를 VCFtools version 0.1.16 소프트웨어로 필터링하였다(Danecek et al, 2011). 선택된 SNP 간 연관 불평형(linkage disequilibrium, LD)을 기반으로 대립 유전자 빈도를 평가하였으며, 50bp 내에 반복 영역이 없고 MAF가 가장 높은 SNP를 우선적으로 선택하였다. 마지막으로, 선택된 SNP에 대한 probe 디자인 효율성을 검증한 후 Affymetrix의 Axiom Custom SNP 60K chip을 개발하였다.

4. Genomic DNA extraction, genotyping, and quality control

넙치 꼬리 지느러미 샘플에서 총 2,939개체의 genomic DNA를 Chelex 100 (Bio-Rad, USA)을 이용해 추출하였다. 꼬리 지느러미 샘플은 5% Chelex 100 (Bio-Rad, USA)과 0.02% Protase K (Roche, Swiss)를 포함한 150 μ l 용액에 담갔으며, 이 혼합물은 Thermocycler (Bio-Rad, USA)에서 55°C에서 1시간, 이어서 100°C에서 10분간 배양되었다. 추출된 genomic DNA는 4°C에서 저장되었다. 총 2,939 개체에 대해 60K SNP Affymetrix® Axiom® myDesign™ Genotyping Array를 사용하여 유전자형 분석을 실시하였다. SNP quality control 과정에서 MAF가 0.05 미만이거나 유전자형 누락률이 0.1을 초과하는 SNP는 PLINK version 1.9 (Chang et al, 2015)를 이용하여 제거하였다. 최종적으로 54,305개의 염색체 SNP마커가 분석에 사용되었다.

5. Statistical analysis

넙치 집단 내 유전적 구조를 파악하기 위해 PLINK version 1.9 (Chang et al, 2015)를 활용하여 주성분 분석(principal component analysis, PCA)을 수행하였으며, 추출된 주성분은 집단 구조를 보정하는 데에 이용되었다.

넙치 집단에서 에드워드병 내병성에 영향을 미치는 유전적 좌위를 식별하기 위해 염색체에 위치한 54,305개의 SNP 마커를 대상으로 SPACox 소프트웨어를 이용하여 GWAS를 수행하였다 (Bi et al, 2020). 전장 유전체 유의성에 대한 임계 수치는 Bonferroni 방법을 이용하여 마커 수($n=54,305$)를 0.05로 나눈 값인 $9.21E-07$ 으로 설정되었다. GWAS 결과 시각화를 위해 R version 4.2.3의 CMplot 패키지를 사용하여 플롯을 생성하였다(Yin et al, 2021).

SPACox version 0.1.2를 사용하여 time-to-event 데이터를 기반으로 한 GWAS를 실시하였으며(Bi et al, 2020), 이 소프트웨어는 Cox proportional hazard (Cox PH) 모형을 적합시킨 후, martingale 잔차의 empirical cumulant generating function (CGF)를 추정하고 saddle point approximation을 적용하여 p-value를 보정한다. 집단 구조에 의한 confounder를 통제하기 위해 25개의 주성분을 공변량으로 사용하였다. 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 25개의 주성분을 포함하는 공변량 벡터, G_i 는 대립유전자 개수(0, 1 또는 2)를 나타내며, β 는 변이에 따른 유전적 효과를 나타낸다.

에드워드병 내병성과 관련된 SNP의 효과를 정량화하기 위해 유의적으로 표현형과 관련성을 보이는 SNP들의 hazard ratio를 추정하였다. 생존 데이터를 분석하여 Kaplan-Meier 생존 곡선을 작성하고, 95% 신뢰구간을 포함한 hazard ratio를 추정하였다. Cox PH 회귀 분석은 25개의 주성분을 예측 변수로 지정하여 수행하였으며, 해당 분석은 SAS/STAT® version 9.4를 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

에드워드병 내병성과 관련성을 보이는 SNP들의 위치 후보 유전자는 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)를 이용하여 SNP와 가장 가깝게 위치한 유전자로 지정하였다.

p-value가 전장 유전체 유의적 임계 수준을 넘지 않지만 표현형 변이에 영향을 미칠 수 있는 변이들(p-value<0.05)의 $\pm 1.5\text{kb}$ 내에 위치하는 유전자들이 기능하는 생물학적 경로를 Enrichr 데이터베이스의 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 라이브러리를 사용하여 확인하였다(Kanehisa and Goto, 2000; Xie et al, 2021).

RESULTS AND DISCUSSION

1. *Edwardsiella tarda*에 대한 생존율

부 48개체, 모 49개체로부터 생산된 2,939마리의 넙치를 *E. tarda*에 감염시켜 15일 동안 생존율을 분석한 결과, 평균 생존 기간은 13.25일이었으며, 최종적으로 939마리가 생존하여 32%의 생존율을 나타냈다(Fig. 1A).

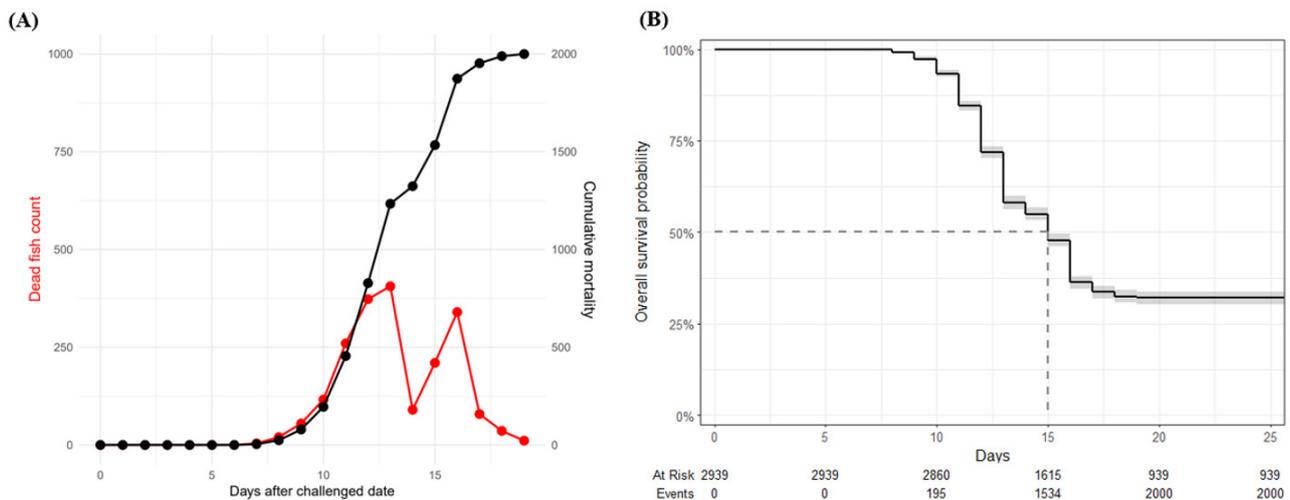


Figure 1. (A) Cumulative mortality rate (black) and number of dead fish (red) during the *E. tarda* challenge experiment, and (B) Kaplan-Meier survival curve showing overall survival probability during the *E. tarda* challenge.

동일 코호트를 카플란-마이어 생존분석을 통해 분석한 결과, *E. tarda* 감염 후 초기 10일까지는 90% 이상의 높은 생존율을 유지하였으나, 10일 이후부터 급격한 폐사가 시작되어 15일째에 약 50%의 생존율을 보였음을 관찰할 수 있다. 이후, 20일까지 폐사가 지속되었으며, 실험 종료 시점인 25일째에는 최종적으로 32%의 생존율을 나타내었다(Fig. 1B)

2. 유전자형 분석

유전자형 분석을 통해 넙치 2,939개체군에서 56,185개의 염색체 상 SNP 마커를 얻었다. 이 중, 유전자형 누락 기준을 초과한 731개의 변이와 MAF 기준을 충족하지 못한 472개의 변이가 제거되었고, 최종적으로 2,939마리의 넙치에서 54,305개의 변이가 GWAS에 사용되었다.

3. 전장 유전체 관련성 분석

GWAS에 앞서, SPACox에서 활용할 PC 값을 산출하기 위해 PCA를 실시하였다. 상위 25개의 PC 값이 집단 내 유전 구조의 79.08%를 설명하였으며, 이를 바탕으로 SPACox 분석 모델에서 상위 25개의 PC 값을 사용해 편향을 보정하였다.

우리는 SPACox 소프트웨어를 사용하여 GWAS 분석을 진행하였고, 10번, 13번, 18번, 21번 염색체에서 에드워드병 내병성과 관련성을 보이는 4개의 SNP를 확인하였으며(Fig. 2, Table 1), 해당 SNP들의 유전자형 별 생존 곡선은 Fig. 3에 나타내었다.

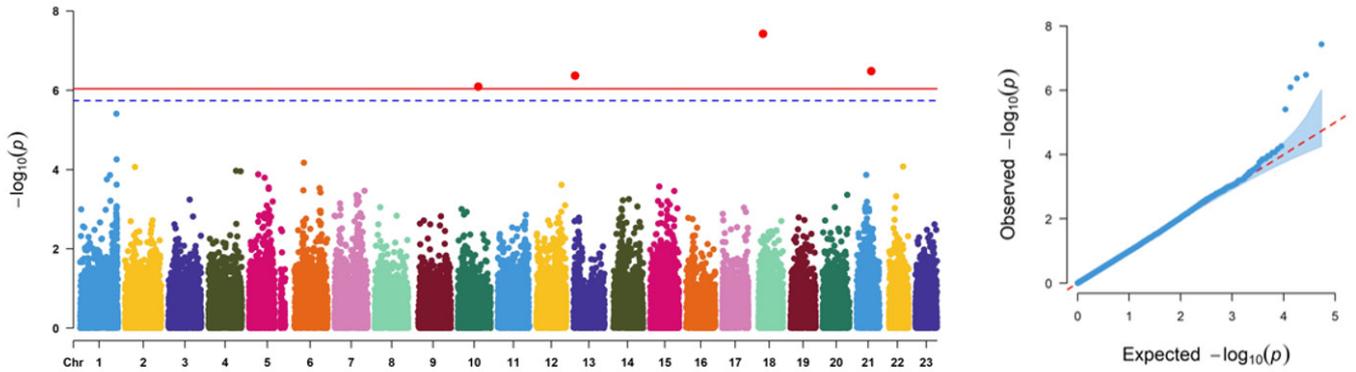


Figure 2. Manhattan plot (left) and quantile-quantile plot (right) from genome-wide association study for Edwardsiellosis resistance of olive flounders.

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

CHR	SNP	Position (bp)	MAF	p-value	HR ¹⁾ (95% CI)	Gene ²⁾
10	c.16484634C>G	16,484,634	0.39	8.15E-07	1.33 (1.15-1.54)	<i>STXBP5L</i>
13	c.1244349T>C	1,244,349	0.07	4.27E-07	1.45 (1.25-1.69)	<i>MEF2D</i>
18	c.6165154A>G	6,165,154	0.26	3.75E-08	1.25 (1.00-1.56)	<i>HOMER1</i>
21	c.11772541G>T	11,772,541	0.37	3.31E-07	1.26 (1.14-1.40)	<i>LOC109626663</i>

¹⁾, Hazard ratio (95% confidence interval) of the SNP; ²⁾, nearest gene to the SNP

10번 염색체에 위치한 c.16484634C>G는 *STXBP5L* (*Syntaxin-binding protein 5-like*) 내에 있으며, *STXBP5*는 혈관 내피 세포의 외포 작용을 억제하고, 혈소판 활성화 및 염증 매개 물질의 분비에 관여한다(Zhu, Q. et al, 2014). 활성화된 혈소판은 염증 반응을 조절하며, 면역 세포와 상호작용하여 혈류를 통해 병원체를 제거하는 데 기여한다(Wong et al, 2013). 이러한 과정은 에드워드병과 같은 세균 감염에 대한 숙주의 방어 메커니즘에서 중요한 역할을 한다. 13번 염색체에 위치한 c.1244349T>C의 위치 후보 유전자 *MEF2D*는 염증 반응을 매개하여 면역 반응에 기여한다(Szeto et al, 2024; Lu et al, 2021). 18번 염색체의 c.6165154의 위치 후보 유전자인 *HOMER1* 역시 염증 반응을 통해 면역 체계에 관여하는 것으로 알려져 있다(Fei et al, 2022).

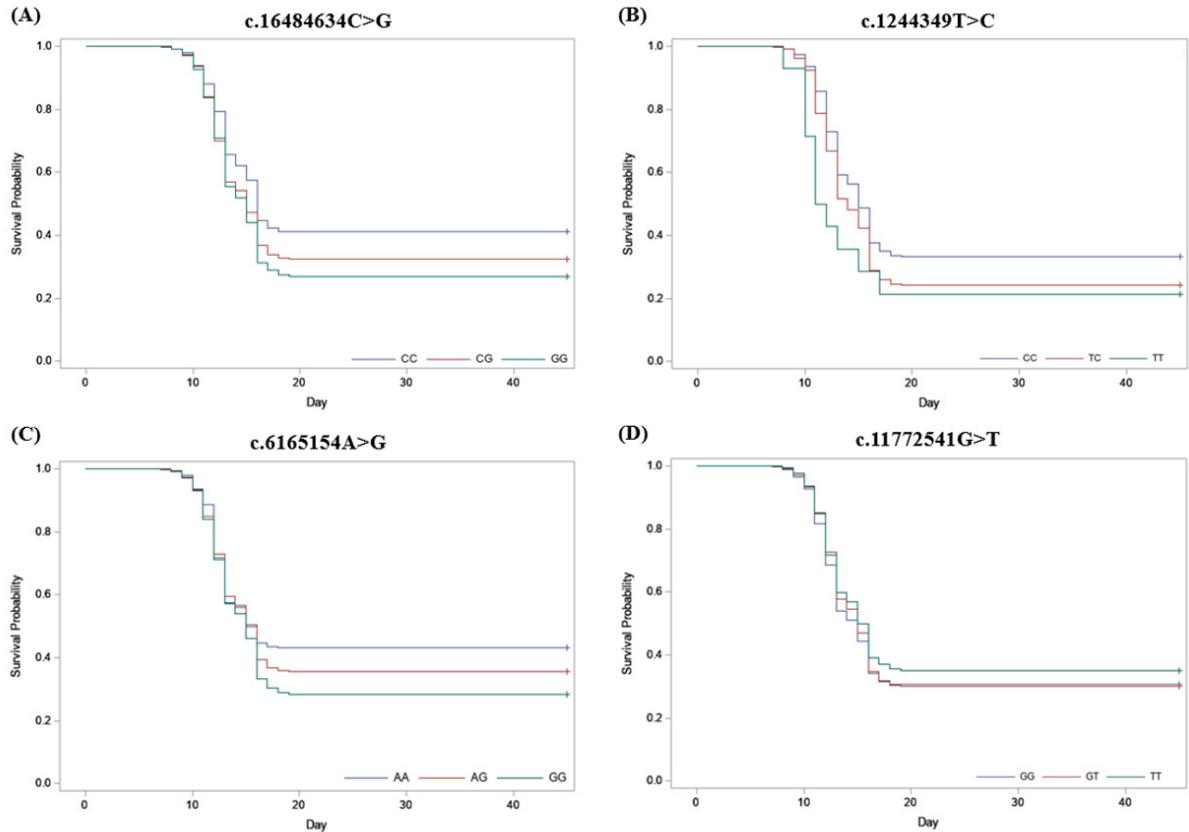


Figure 3. Survival curve plots for Edwardsiellosis of (A) c.16484634C>G, (B) c.1244349T>C, (C) c.6165154A>G, and (D) c.11772541G>T.

이 세 위치 후보 유전자가 모두 면역 반응과 관련이 있다는 점은 에드워드병에 대한 내병성에 중요한 영향을 미칠 가능성을 시사하며, 추가 연구를 통해 위치 후보 유전자들의 에드워드병 내병성 증가 기여를 모색하는 데 중요한 단서를 제공할 수 있을 것이다.

에드워드병 내병성에 영향을 미칠 수 있는 위치 후보 유전자들의 분자적 기전을 탐색하고 유전자 사이의 상호작용을 규명하고자 생물학적 경로 분석과 유전자 네트워크 분석을 수행하였다. SPACox 소프트웨어를 활용한 GWAS 결과 nominal p-value가 0.05 미만인 SNP의 수는 2,710개였으며, SNP들로부터 ± 1.5 kb 내에 위치한 유전자의 수는 659개로 파악되었다. 659개의 유전자를 이용하여 KEGG pathway 분석을 수행한 결과 20개의 유의적인 생물학적 경로를 확인할 수 있었다 (Table 2).

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

Term	p-value ¹⁾	Genes
Axon guidance	< 0.001	ITRPC6, NFATC3, PTPN11, MET, SEMA4D, PRKCA <i>et al.</i>
Apelin signaling pathway	< 0.01	MTOR, PPARGC1A, RYR3, PLCB1, ADCY1 <i>et al.</i>
Focal adhesion	< 0.01	PRKCA, ITGA1, MET, PIP5K1C, DOCK1, PTK2 <i>et al.</i>
Morphine addiction	< 0.01	PRKCA, ADCY1, ADCY7, GABRB3, GABBR2, GABRA3 <i>et al.</i>
Glutamatergic synapse	< 0.01	PRKCA, ADCY1, ADCY7, PLCB1, HOMER1 <i>et al.</i>
ECM-receptor interaction	< 0.01	ITGA1, ITGA11, RELN, LAMC3, COL9A1, AGRN <i>et al.</i>
Calcium signaling pathway	< 0.05	PRKCA, MST1R, ADCY1, RYR3, PLCB1, MET, STIM1 <i>et al.</i>
Citrate cycle (TCA cycle)	< 0.05	PC, SUCLG1, ACO2, SDHB
Spinocerebellar ataxia	< 0.05	PRKCA, PLCB1, MTOR, MAP3K5, ERN1, GRIN2A <i>et al.</i>
Rap1 signaling pathway	< 0.05	PRKCA, ADCY1, PLCB1, MET, RAPGEF6, RASGRP2 <i>et al.</i>
Phospholipase D signaling pathway	< 0.05	PRKCA, PTPN11, PIP5K1C, ADCY1, PLCB1, MTOR <i>et al.</i>
Retrograde endocannabinoid signaling	< 0.05	PRKCA, ADCY1, PLCB1, GABRB3, GNG4, NDUFS4 <i>et al.</i>
GABAergic synapse	< 0.05	PRKCA, ADCY1, GABRB3, GABBR2, GNG4, GABRA3, ADCY7
Non-small cell lung cancer	< 0.05	PRKCA, MET, CASP9, ALK, CDK4, CASP9
Insulin signaling pathway	< 0.05	MTOR, RPTOR, RHEB, PPARGC1A, INPP5A, RPS6, ACACA <i>et al.</i>
Circadian entrainment	< 0.05	PRKCA, ADCY1, ADCY7, PLCB1, RYR3, GRIN2A, GNG4
Glycine, serine and threonine metabolism	< 0.05	CHDH, AMT, SARDH, PIPOX
PI3K-Akt signaling pathway	< 0.05	PRKCA, MTOR, RPTOR, CASP9, ITGA1, MET, RHEB <i>et al.</i>
Thyroid hormone signaling pathway	< 0.05	CASP9, PRKCA, PLCB1, MTOR, RHEB, MED13, MED24, ESRI
cGMP-PKG signaling pathway	< 0.05	TRPC6, NFATC3, ADCY1, PLCB1, MEF2A, MEF2C, PDE3A <i>et al.</i>

¹⁾, Nominal p-value

20개의 유의적인 생물학적 경로 중 면역 작용과 관련이 있는 경로들이 다수 식별되었으며, 이에는 Apelin signaling pathway, Focal adhesion, ECM-receptor interaction, Calcium signaling pathway, Rap1 signaling pathway, Phospholipase D signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, cGMP-PKG signaling pathway가 포함된다. Apelin signaling pathway는 염증 반응 및 면역 반응과 관련이 있으며, 세균 감염 시 면역 세포 활성화에 영향을 줄 수 있다. 이는 *E. tarda* 감염 시에도 Apelin-13이 대식세포 및 기타 면역 세포에서 염증성 반응을 조절하는 데 기여할 가능성을 시사한다. 특히 Apelin 신호가 ROS 생성 억제 및 대사 재프로그래밍을 통해 염증성 손상을 줄이는 기작은 에드워드병에 대한 내병성을 증가시킬 수 있는 중요한 기전으로 작용할 수 있다(Xia *et al.*, 2021; Yuan *et al.*, 2022). Focal adhesion은 세포 외부 신호를 세포 내부로 전달하는 중요한 단백질 복합체로, 면역 세포의 이동과 활성화에 핵심적인 역할을 한다. 이러한 과정은 염증 반응 및 감염에서 중요한 기능을 수행한다(Harjupää *et al.*, 2019). 이는 에드워드병 감염 상황에서, Focal adhesion이 면역 세포의 이동 및 활성화를 조절해 감염에 대한 내병성에 영향을 미칠 가능성을 시사한다. ECM-receptor interaction은 병원균이 숙주 세포에 부착하고 감염을 확산시키는 중요한 기전으로 작용한다. 또한, ECM 리모델링은 병원균의 침투를 촉진하거나 저지하는 주요 요인으로 감염 내병성 강화에 기여할 수 있다(Vaca *et al.*, 2020; Pfisterer *et al.*, 2021). Calcium signaling은 수지상 세포의 성숙 및 항원 제시와 같은 주요 면역 기능을 조절하는 데 중요한 역할을 하며, 특히 대식세포와 수지상 세포와 같은 식세포에서 칼슘 매개 신호는 phagosome 성숙과 적응 면역 반응의 시작에 필수적이다(Connolly and Kusner, 2007). 에드워드병의 경우에도 칼슘 신호전달이 면역 세포 반응을 조절하고 병원체 내병성을 증대시키는 역할을 할 가능성이 있다. Rap1은 염증 반응과 면역 세포의 이동, 부착 과정에서 중요한 조절자로서, 세균 감염에 대한 면역 반응에서 핵심적인 역할을 수행한다(Jaskiewicz *et al.*, 2018). Phospholipase D (PLD)는 인지질을 분해하여 세포 신호 전달에 관여하는 phosphatidic acid를 생성하는 효소로, 특히 T 세포 활성화와 면역 반응 조절에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며(Zhu, M. *et al.*, 2018), 이는 PLD signaling pathway가 *E. tarda* 감염에 대한 면역 반응에도 관여할 가능성을 시사한다. PI3K-Akt signaling pathway는 대식세포의 M1/M2 극화를 조절하여 염증 반응의 균형을 맞추고 병원체 제거에 기여하는 것으로 알려져 있다(Arranz *et al.*, 2012; Guilletmet-Guibert *et al.*, 2008; Vergadi *et al.*, 2014). 따라서 본 연구에서 발견된

PI3K-Akt signaling pathway의 유의성은 에드워드병 감염에 대한 면역 반응과 내병성 메커니즘을 설명하는 데 중요한 단서를 제공할 수 있다. 따라서 본 연구는 다양한 신호 전달 경로와 분자적 메커니즘들이 에드워드병에 대한 내병성 형성에 중요한 역할을 한다는 점을 시사하며, 향후 이러한 경로를 표적으로 한 연구는 에드워드병 내병성 증가에 기여할 수 있을 것이다.

CONCLUSION

본 연구는 넙치 집단에서 *E. tarda*에 대한 내병성을 유전적으로 분석하여, 내병성과 관련된 유전자들을 식별하고 이들이 관여하는 생물학적 경로를 규명했다. 전장 유전체 관련성 분석(GWAS)을 통해 10번, 13번, 18번, 21번 염색체에서 내병성과 유의한 관련성을 보이는 4개의 SNP를 발견하였으며, 이들 SNP가 위치한 후보 유전자는 염증 반응 및 면역 조절에 기여하는 것으로 확인되었다. 특히, *STXBPSL*, *MEF2D*, *HOMER1*과 같은 유전자가 에드워드병 내병성에 중요한 역할을 할 가능성을 보여주었으며, 이는 향후 어류 육종 프로그램에서 질병 내병성 증대를 위한 중요한 유전적 자원으로 활용될 수 있다.

생물학적 경로 분석에서는 Apelin signaling, ECM-receptor interaction, Calcium signaling, PI3K-Akt signaling 등 다양한 경로가 *E. tarda* 감염에 대한 내병성과 관련이 있음을 확인하였다. 이러한 경로들은 면역 세포의 활성화, 병원체 제거, 염증 조절 등 감염에 대한 숙주의 방어 메커니즘에 기여한다.

본 연구는 *E. tarda* 감염에 대한 유전적 내병성을 심도 있게 분석하여, 질병 내병성에 기여하는 유전적 요소와 이들이 관여하는 분자적 기전을 규명함으로써, 향후 넙치 양식업에서 질병 관리는 위한 육종 전략 수립에 기여할 수 있을 것이다. 추가적으로, 본 연구에서 확인된 유전자 및 경로들을 기반으로 한 후속 연구는 *E. tarda* 내병성을 보다 정밀하게 이해하고 이를 강화하는 데 중요한 역할을 할 것이다.

ACKNOWLEDGEMENTS

이 논문은 국립수산물품질관리원(수산물품질연구사업 R2024032)의 지원으로 수행되었습니다.

REFERENCES

- Arranz A., Doxaki C., Vergadi E., Martinez de la Torre Y., Vaporidi K., Lagoudaki E. D., Ieronymaki E., Androulidaki A., Venihaki M. and Margioris A. N. 2012. Akt1 and Akt2 protein kinases differentially contribute to macrophage polarization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(24):9517–9522.
- 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.
- Connolly S. F. and Kusner D. J. 2007. The regulation of dendritic cell function by calcium-signaling and its inhibition by microbial pathogens. *Immunol.Res.* 39:115–127.
- 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.
- Ewing W. H., McWhorter A. C., Escobar M. R. and Lubin A. H. 1965. Edwardsiella, a new genus of Enterobacteriaceae based on a new species, *E. tarda*. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* 15(1):33–38.

- Fei X., Dou Y., Wang L., Wu X., Huan Y., Wu S., He X., Lv W., Wei J. and Fei Z. 2022. Homer1 promotes the conversion of A1 astrocytes to A2 astrocytes and improves the recovery of transgenic mice after intracerebral hemorrhage. *Journal of Neuroinflammation*. 19(1):67.
- Guillemet-Guibert J., Bjorklof K., Salpekar A., Gonella C., Ramadani F., Bilancio A., Meek S., Smith A. J., Okkenhaug K. and Vanhaesebroeck B. 2008. The p110 β isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110 γ . *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105(24):8292–8297.
- Harjunpää H., Lloret Asens M., Guenther C. and Fagerholm S. C. 2019. Cell adhesion molecules and their roles and regulation in the immune and tumor microenvironment. *Frontiers in immunology*. 10:1078.
- 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.
- Jaśkiewicz A., Pająk B. and Orzechowski A. 2018. The many faces of Rap1 GTPase. *International journal of molecular sciences*. 19(10):2848.
- 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.
- Liu F., Tang X., Sheng X., Xing J. and Zhan W. 2016. Edwardsiella tarda Outer Membrane Protein C: An Immunogenic Protein Induces Highly Protective Effects in Flounder (*Paralichthys olivaceus*) against Edwardsiellosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 17(7)
- Lu F., Wang R., Xia L., Nie T., Gao F., Yang S., Huang L., Shao K., Liu J. and Yang Q. 2021. Regulation of IFN-Is by MEF2D promotes inflammatory homeostasis in microglia. *Journal of Inflammation Research*. :2851–2863.
- Mohanty B. R. and Sahoo P. K. 2007. Edwardsiellosis in fish: a brief review. *J.Biosci*. 32(3):1331–1344.
- Park S. B., Aoki T. and Jung T. S. 2012. Pathogenesis of and strategies for preventing *Edwardsiella tarda* infection in fish. *Vet. Res*. 43(1):67.
- 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.
- Preena P. G., Dharmaratnam A. and Swaminathan T. R. 2022. A peek into mass mortality caused by antimicrobial resistant *Edwardsiella tarda* in goldfish, *Carassius auratus* in Kerala. *Biologia*. 77(4):1161–1171.
- Sommerset I., Krossøy B., Biering E. and Frost P. 2005. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert review of vaccines*. 4(1):89–101.
- Sun K., Wang H., Zhang M., Xiao Z. and Sun L. 2009. Genetic mechanisms of multi-antimicrobial resistance in a pathogenic *Edwardsiella tarda* strain. *Aquaculture*. 289(1-2):134–139.
- Szeto A. C., Clark P. A., Ferreira A. C., Heycock M., Griffiths E. L., Jou E., Mannion J., Luan S., Storrar S. and Knolle M. D. 2024. Mef2d potentiates type-2 immune responses and allergic lung inflammation. *Science*. 384(6703):eadl0370.
- 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.
- 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.
- Vergadi E., Vaporidi K., Theodorakis E. E., Doxaki C., Lagoudaki E., Ieronymaki E., Alexaki V. I., Helms M., Kondili E. and Soennichsen B. 2014. Akt2 deficiency protects from acute lung injury via alternative macrophage activation and miR-146a induction in mice. *The Journal of Immunology*. 192(1):394–406.

- Vishnupriya V., Swaminathan T. R., Dharmarathnam A., Sharma S. R. K. and Preena P. G. 2024. Virulent and Multi-drug-Resistant *Edwardsiella tarda* Infection in Oscar Fish: Unveiling the Threat of Mass Mortality and AMR Dissemination. *Curr.Microbiol.* 81(7):174.
- Wang Q., Yang M., Xiao J., Wu H., Wang X., Lv Y., Xu L., Zheng H., Wang S., Zhao G., Liu Q. and Zhang Y. 2009. Genome Sequence of the Versatile Fish Pathogen *Edwardsiella tarda* Provides Insights into its Adaptation to Broad Host Ranges and Intracellular Niches. *PLOS ONE.* 4(10):e7646.
- Wong C. H., Jenne C. N., Petri B., Chrobok N. L. and Kubes P. 2013. Nucleation of platelets with blood-borne pathogens on Kupffer cells precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance. *Nat.Immunol.* 14(8):785–792.
- Xia F., Chen H., Jin Z. and Fu Z. 2021. Apelin-13 protects the lungs from ischemia-reperfusion injury by attenuating inflammatory and oxidative stress. *Hum.Exp.Toxicol.* 40(4):685–694.
- Xiao J., Wang Q., Liu Q., Wang X., Liu H. and Zhang Y. 2008. Isolation and identification of fish pathogen *Edwardsiella tarda* from mariculture in China. *Aquacult.Res.* 40(1):13–17.
- Xie Z., Bailey A., Kuleshov M. V., Clarke D. J., Evangelista J. E., Jenkins S. L., Lachmann A., Wojciechowiec 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.
- Yuan Y., Wang W., Zhang Y., Hong Q., Huang W., Li L., Xie Z., Chen Y., Li X. and Meng Y. 2022. Apelin-13 attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses and acute lung injury by regulating PFKFB3-driven glycolysis induced by NOX4-dependent ROS. *Journal of Inflammation Research.* :2121–2139.
- Zhu M., Foreman D. P., O'Brien S. A., Jin Y. and Zhang W. 2018. Phospholipase D in TCR-mediated signaling and T cell activation. *The Journal of Immunology.* 200(6):2165–2173.
- Zhu Q., Yamakuchi M., Ture S., de la Luz Garcia-Hernandez M., Ko K. A., Modjeski K. L., LoMonaco M. B., Johnson A. D., O'Donnell C. J. and Takai Y. 2014. Syntaxin-binding protein STXBP5 inhibits endothelial exocytosis and promotes platelet secretion. *J.Clin.Invest.* 124(10):4503–4516.