

ANIMAL

Genome-wide association study identifies positional candidate genes affecting back fat thickness trait in pigs

Jae-Bong Lee¹, Ho-Chan Kang², Eun-Ho Kim², Yoon-Joo Kim², Chae-Kyoung Yoo³, Tae-Jeong Choi⁴, Hyun-Tae Lim^{2,3,*}

¹Korea Zoonosis Research Institute (KoZRI), Chonbuk National University, Iksan 54531, Korea

²Division of Applied Life Science (BK21 plus), Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea

³Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea

⁴Swine Science Division, National Institute of Animal Science, RDA, Cheonan 31000, Korea

*Corresponding author: s_hitim@gnu.ac.kr

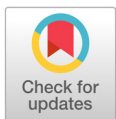
Abstract

This study was done to search for positional candidate genes associated with the back fat thickness trait using a Genome-Wide Association Study (GWAS) in purebred Yorkshires (N = 1755). Genotype and phenotype analyses were done for 1,642 samples. As a result of the associations with back fat thickness using the Gemma program (ver. 0.93), when the genome-wide suggestive threshold was determined using the Bonferroni method ($p = 1.61 \times 10^{-5}$), the single nucleotide polymorphism (SNP) markers with suggestive significance were identified in 1 SNP marker on chromosome 2 (MARC0053928; $p = 3.65 \times 10^{-6}$), 2 SNP markers on chromosome 14 (ALGA0083078; $p = 7.85 \times 10^{-6}$, INRA0048453; $p = 1.27 \times 10^{-5}$), and 1 SNP marker on chromosome 18 (ALGA0120564; $p = 1.44 \times 10^{-5}$). We could select positional candidate genes (*KCNQ1*, *DOCK1*, *LOC106506151*, and *LOC110257583*), located close to the SNP markers. Among these, we identified a potassium voltage-gated channel subfamily Q member gene (*KCNQ1*) and the dedicator of cytokinesis 1 (*DOCK1*) gene associated with obesity and Type-2 diabetes. The SNPs and haplotypes of the *KCNQ1* and *DOCK1* genes can contribute to understanding the genetic structure of back fat thickness. Additionally, it may provide basic data regarding marker assisted selection for a meat quality trait in pigs.

Keywords: back fat thickness, GWAS, positional candidate gene, purebred Yorkshire

Introduction

돼지는 인간에게 중요한 동물성 단백질 공급원이며, 등지방 두께와 근내지방 함량은 상업용 시장에서 선별 기준으로 고려되는 육질에 영향을 미치는 주요 인자로 알려져있다(Borchers et al., 1997; Gerbens et al., 2001). 이와 관련하여 등지방 두께는 육량을 증가시키기 위해 등지방을 얇게 개량하는 외국의 선호도와 달라서, 등지방을 증가시키거나 더 이상 얇아지지 않도록 유지하려는 개량 방향으로 다시 개량하는 형질 중 하나이다. 돼지 등지방 두께는 일반적으로 피하지방이 많지만 견부와 요부



OPEN ACCESS

Citation: Lee JB, Kang HC, Kim EH, Kim YJ, Yoo CK, Choi TJ, Lim HT. 2018. Genome-wide association study identifies positional candidate genes affecting back fat thickness trait in pigs. Korean Journal of Agricultural Science. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20180055>

DOI: <https://doi.org/10.7744/kjoas.20180055>

Received: May 4, 2018

Revised: July 3, 2018

Accepted: July 24, 2018

Copyright: © 2018 Korean Journal of Agricultural Science



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.

에 두텁게 부착되어 등의 중심부의 지방은 얇고 일정하게 부착되어 등급 규격에서는 제 11 - 12 늑골 부위와 마지막 늑골과 첫번째 요추 사이에서 등지방 두께를 측정하여 평균치를 내어 지육평가의 기준으로 하고 있다.

Yorkshire 품종은 베이컨형으로 육성되었으나, 근래에는 육용형(Meat type)으로 개량되어 육질이 양호하다. 장점은 번식 능력과 포유능력이 우수하며 Landrace 종 또는 Duroc 종과 교배에 의해서 생선된 1대 잡종은 산자능력이 우수하여 3원 교잡종 생산을 위한 모계로 널리 사용되고 있다.

최근 한국재래돼지(Korean Native pig, KNP)와 Landrace 교배에서 육질 및 등지방 두께와 관련된 양적형질좌위(Quantitative trait loci, QTL)가 돼지 염색체(*Sus scrofa* chromosome, SSC) SSC6, SSC8에 보고 되었으며(Lee et al., 2012; Kang et al., 2016), ryanodine receptor 1 (*RYR1*), obesity-associated (*FTO*), prostaglandin I2 synthase (*PTGIS*), nuclear protein 4 (*NOL4*) 등의 유전자들이 육질 및 지방축적과 연관되어 있다고 보고 되었다(Fujii et al., 1991; Fontanesi et al., 2009; Li et al., 2011). 또한 KNP × Landrace 교배집단에서 등지방 형질과 연관된 QTL 영역(*SW1482 - SW963*)을 보고 하였으며(Yoo et al., 2012), 이 영역에 포함하는 glutamate receptor-interacting protein 1 (*GRIP1*) 유전자를 위치상 후보유전자로 보고 하였다(Lee et al., 2017).

본 연구에서는 Yorkshire를 이용하여 등지방 두께와 관련된 유의적인 genome 상의 위치를 확인하고, 개량에 도움을 줄 수 있는 위치상 후보유전자 탐색을 하고자 실시하였다.

Materials and Methods

공시 동물 및 DNA 추출

농협 종돈장에서 1755두의 모근을 제공 받아 genomic DNA 를 분리 하였다.

등지방 두께 형질 측정

Yorkshire 축군 1755두의 등지방 두께 측정은 검정종료시에 한번 측정을 하고 초음파 A mode를 이용해서 측정하였다. 어깨(제4늑골), 등(최후늑골), 허리(최후요추) 이렇게 세 곳을 측정하고 평균을 사용하였으며 아래의 식으로 보정하였다.

$$\text{보정된 등지방 두께} = \text{측정시 등지방 두께} + ((90 \text{ kg} - \text{종료체중}) \times \text{측정시 등지방 두께} / (\text{종료체중} - 11.34)) \quad (1)$$

통계분석에 앞서 측정된 형질은 MINITAB 프로그램(Minitab Inc., USA)에서 구현이 되는 Ryan-Joiner 방법(Ryan and Joiner, 1976)을 이용하여 normality test를 실시하고 이상치를 제거하였다.

Genome-Wide association Study

돼지의 gDNA를 Porcine Single Nucleotide Polymorphism (SNP) 60K bead chip (Illumina, USA)를 이용하여 61,565개의 SNP 유전자형 분석을 실시하였다. Plink 프로그램 version 1.07 (<http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/tutorial.shtml>, Purcell et al., 2007)을 이용하여 Minor allele frequency (MAF) < 0.05, genotyping error > 0.1, Hardy-Weinberg equilibrium (p-value ≤ 0.000001) 순서대로 SNP marker들을 제거하여 최종적으로 45,214개의 SNP marker를 GEMMA v0.93 (<http://www.xzlab.org/software.html>, Zhou and Stephens, 2012) 프로그램에서 제공되는 일변량선형혼합모형 옵션을 이용하여 각각의 양적 형질에 대하여 전장유전체관련성분석을~ 수행하였다. GEMMA를 이용하면 집단 및 샘플의 구조를 보정한 Genome-Wide Association Study (GWAS)를 수행 할 수 있다. GWAS를 수행하기 위한 통계모형은 다음과 같다.

$$y = W\alpha + x\beta + u + \epsilon; u \sim MVN_n(0, \lambda\tau^{-1}K), \epsilon \sim MVN_n(0, \tau^{-1}I_n) \quad (2)$$

여기서, y 는 형질 측정치 벡터이고, W 는 성별, 농장, 배치, 종료체중 및 1로 구성된 열을 포함한 고정효과 공변량 행렬이며, α 는 절편을 포함하는 해당 계수 벡터이며, x 는 유전자형 벡터이고, β 는 각 marker들의 효과의 크기를 나타낸다. u 는 임의 효과 벡터로서 다변량정규분포를 따르는데 여기서 τ^{-1} 는 잔차의 분산이며, λ 는 τ^{-1} 와 잔차 간의 비율이며, K 는 상염색체상의 SNP marker를 이용해서 계산한 유전체관계행렬을 나타내며, ϵ 는 잔차벡터로서 다변량정규분포를 따르며 I_n 는 항등행렬이다.

Genome-wide 임계수준(suggestive threshold level)은 Bonferroni method (1/SNP marker의 수; $p = 1.61 \times 10^{-5}$)를 이용하였다. 2, 14, 18염색체에서 탐지된 등지방 두께와 연관된 후보유전자는 NCBI database (<http://www.ncbi.nih.gov>)를 이용하여 탐색하였다.

Results and Discussion

Yorkshire 집단 1,755두 중 결측치와 이상치를 제외한 1,642두의 생시체중 평균값과 표준편차는 1.4714 ± 0.2521 cm이고, 최소값은 0.83 cm, 최대값은 2.31 cm 이었다(Table 1). 한국재래돼지에서 등지방 두께는 2.098 ± 0.431 , KNP \times Landrace 축군에서 F_2 는 2.293 ± 0.6897 로 보고 하였다(Yoo et al., 2012; Kim and Kim, 2017).

Porcine SNP 60 K beadchip 분석을 통하여 총 61,565개의 SNP 중 MAF 0.05 이하 49,439개, genotyping error 0.1 이상 49,113개, Hardy-weinberg equilibrium (p-value) 0.000001 이하 48,150개, 최종적으로 42,214개 상염색체의 SNP marker를 확인 하였으며, SNP marker와 등지방 두께 형질 사이의 관련성 분석을 통하여 SNP marker의 Manhattan plot과 Quantile-quantile (QQ) plot을 작성하였다(Fig. 1). 순종 축군의 조합은 선발과 교차에 의하여 이루어지기 때문에 교잡 축군의 조합으로 이루어진 축군에 비해 변이가 적은 특성을 가지고 있다. 이에 다중 비교시 생길 수 있는 오류를 보정하는 방법인 Bonferroni correction (Bland and Altman, 1995)을 적용하여 Genome-wide suggestive ($1/42,214 = 2.37 \times 10^{-5}$)를 적용한 결과 4.63 ($-\log_{10}p$)의 값을 나타내었다(Lander and Kruglyak, 1995).

등지방 두께 형질과 관련하여 유의적 임계수준(genome-wide suggestive level)을 만족하는 SNP marker는 염색체 2, 14, 18번에서 동정되었다. 2번 염색체에서 1개의 SNP marker [MARC0053928 ($p = 3.65 \times 10^{-6}$)], 14번 염색체에서 2개의 SNP

Table 1. Descriptive statistics of back fat thickness trait in Yorkshire.

Trait	N ^z	Mean	Standard deviation	MIN	MAX
Back fat (cm)	1,642	1.4714	0.2521	0.83	2.31

^z Number of animal.

Table 2. Genome-wide association analysis results of SNP markers for back fat thickness trait in Yorkshire.

SSC	SNP	Location (bp) ^x	Allele ^y	MAF	p-value	Closest gene	Var ^z (%)
2	MARC0053928	1,786,591	T/C	0.112	3.65×10^{-6}	Intron : <i>KCNQ1</i>	2.18
14	ALGA0083078	136,755,306	A/G	0.210	7.85×10^{-6}	9,818bp at 3' : <i>DOCK1</i>	1.31
	INRA0048453	137,959,561	T/C	0.436	1.27×10^{-5}	21,099bp at 5' : <i>LOC106506151</i>	1.29
18	ALGA0120564	47,918,285	A/G	0.051	1.44×10^{-5}	36,416bp at 3' : <i>LOC110257583</i>	1.55

SSC, *Sus scrofa* chromosome; SNP, Single Nucleotide Polymorphism; MAF, minor allele frequency.

^x NCBI build 11.1

^y minor/major allele.

^z % phenotypic variance explained by the SNP.

marker [ALGA0083078 ($p = 7.85 \times 10^{-6}$), INRA0048453 ($p = 1.27 \times 10^{-5}$)], 18번 염색체에서 1개의 SNP marker marker [ALGA0120564 ($p = 1.44 \times 10^{-5}$)]가 동정되었다(Table 2). 유의적인 p-value를 가지는 SNP marker들에 대하여 가장 근접해 있는 유전자를 위치상 후보 유전자로 선정하였으며, 2번 염색체의 MARC0053928 SNP marker [potassium voltage-gated channel subfamily Q member (*KCNQ1*)], 14번 염색체의 ALGA0083078 [dedicator of cytokinesis 1 (*DOCK1*)], INRA0048453 (*LOC106506151*), 18번 염색체의 ALGA0120564 (*LOC110257583*) 각각의 위치상 후보유전자로 선정되었다. *KCNQ1*은 potassium channel protein으로 심장 활동 전위의 재분극 단계에 필요한 voltage-gated potassium channel을

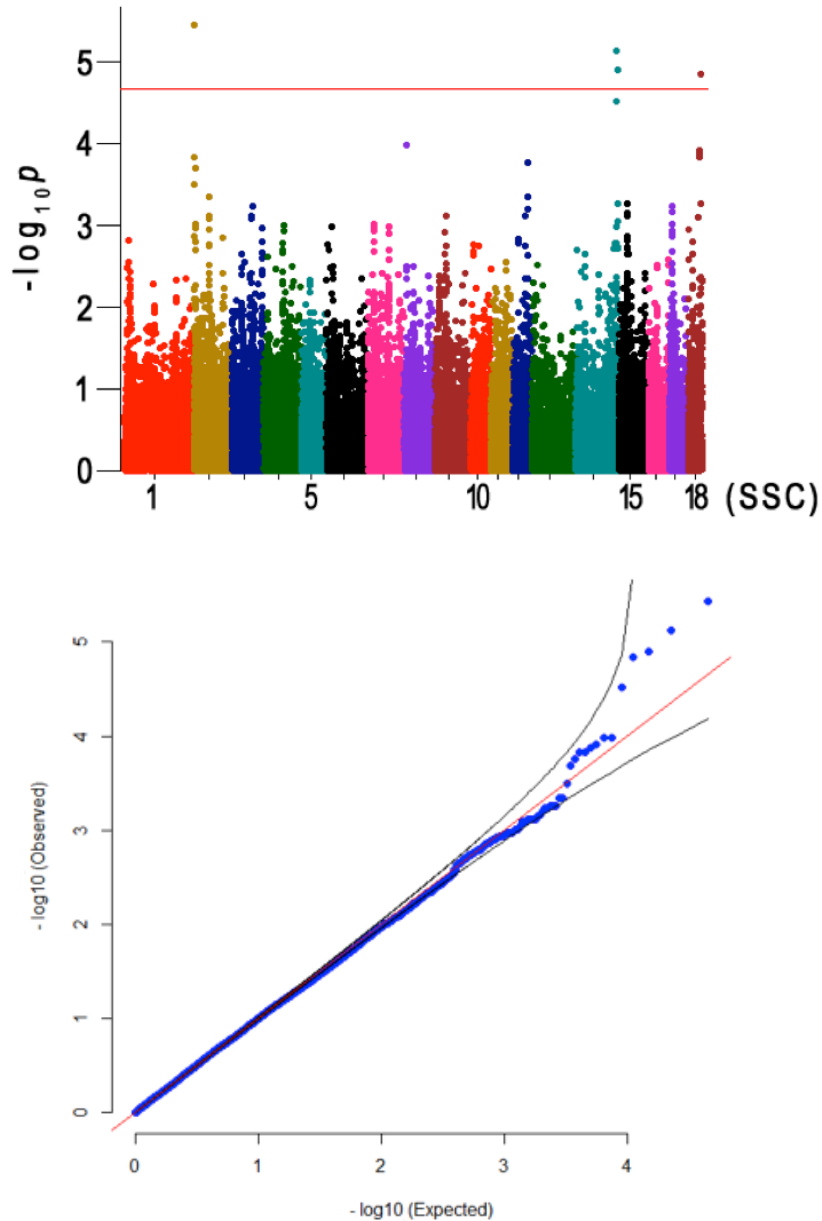


Fig. 1. Manhattan plots (A) and quantile-quantile plots (B) of the GWAS for back fat thickness. The x-axis shows the physical positions of the SNP markers on the pig chromosomes and the association signal on the y-axis (shown as $-\log_{10} p$). The Manhattan plots show the identification for back fat thickness trait on SSC2, 14, 18. GWAS, Genome-Wide Association Study; SNP, Single Nucleotide Polymorphism; SSC, *Sus scrofa* chromosome.

위한 단백질을 암호화하고 있다(Jespersen et al., 2005). *KCNQ1*의 변이는 여러 형태(Long QT syndrome, Short QT syndrome 및 가족성 심방세동)의 부정맥으로 이어질 수 있는 것으로 보고되어있다(Hedley et al., 2009). Okamura et al. (2012)는 일본의 일반 인구 표본에서 *KCNQ1*과 body mass index (BMI) 사이에 유의한 연관성을 발견하였고, Benton et al. (2015)은 *KCNQ1* 유전자를 비만 및 Type-2 diabetes과 관련된 유전자로 제시하였다. 또한 *DOCK1*은 폐, 신장, 복부피하지방 뿐 아니라 여러 조직에서 흔히 발현하는 유전자이다(Li et al., 2017). Wallner et al. (2014)는 부분적 상관관계 분석으로 *DOCK1*이 지질과 특히 plasmalogen의 항상성을 조절하는데 관여 할 수 있는 새로운 잠재적인 핵심 부분으로 제시하였다. Vaughan et al. (2015)은 비만 관련된 형질의 새로운 유전적 표지자를 밝히기 위한 연구에서 사람의 10q26.13 - 10q26.2 region이 adiponectin과 triceps skinfold (삼두근 피부주름)과 관련이 있는 것으로 보고하였고, 이 영역에서 *TOPP* 유전자는 potential candidate genes인 *DOCK1*을 확인하는 유일한 알고리즘인 것으로 확인하였다. *LOC106506151*, *LOC110257583*은 유전자의 기능에 대한 정보가 없었다.

등지방 형질과 관련하여 KNP × Landrace 교배집단에서 보고된 QTL은 5번 염색체에서 Yoo et al. (2012)이 *SW1482* - *SW963* 영역에 위치한다고 보고 하였으며, Lee et al. (2017)은 이 영역에서 *GRIP1* 유전자를 위치상 후보유전자로 보고하였다.

Strucken et al. (2014)은 마지막 늑골의 등지방과 연관된 QTL을 1번 염색체와 유의 하다고 보고 하였으며, 5번 18번 염색체에서 Ribani et al. (2017)은 엉덩이 부근의 등지방과 관련된 QTL을 보고하였다. Schiavo et al. (2014)은 Large white 품종에서 등지방 두께 평균 형질의 QTL은 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16번 염색체를 보고하였다. 이와 같이 등지방 관련 형질이라는 공통점이 있었음에도 본 연구의 결과와 차이를 보였던 원인은 여러가지가 있을 수 있는데 품종, 표본수, 교배 방식등의 차이와 등지방 두께의 측정 부위와 보정식의 차이 때문으로 사료되며, Park et al. (2016)의 내용에 따르면 포유기간 동안 등지방 손실이 발생하여 성별 또한 등지방 두께에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

Conclusion

본 연구에서 Yorkshire 집단의 등지방 두께 형질에 대한 GWAS 분석을 수행한 결과 순종 축군은 다른 축군에 비해 변이가 적은 특성이 있기에, genome-wide suggestive level에서 관련성을 보이는 genome 상 위치를 확인할 수 있었으며, 유의적으로 확인된 2, 14, 18번 염색체의 4개 유전자중 *KCNQ1*과 *DOCK1* 유전자는 등지방 두께 형질의 위치상 후보유전자로서 육질을 선발할 수 있는 기초 연구 자료가 될 것으로 사료 된다.

Acknowledgements

본 연구에 참여한 대학원생은 교육과학기술부 BK21Plus 사업의 장학금을 수혜 받았으며, 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ009971032018)의 지원에 의해 이루어진 것이며, 연구비 지원에 감사 드립니다.

References

- Benton MC, Johnstone A, Eccles D, Harmon B, Hayes MT, Lea RA, Griffiths L, Hoffman EP, Stubbs RS, Macartney-Coxson D. 2015. An analysis of DNA methylation in human adipose tissue reveals differential modification of obesity genes before and after gastric bypass and weight loss. *Genome Biology* 16:8-014-0569-x.

- Bland JM, Altman DG. 1995. Multiple significance tests: The Bonferroni method. *British Medical Journal* 310:170.
- Borchers T, Hohoff C, Buhlmann C, Spener F. 1997. Heart-type fatty acid binding protein - involvement in growth inhibition and differentiation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 57:77-84.
- Fontanesi L, Scotti E, Buttazzoni L, Davoli R, Russo V. 2009. The porcine fat mass and obesity associated (FTO) gene is associated with fat deposition in italian duroc pigs. *Animal Genetics* 40:90-93.
- Fujii J, Otsu K, Zorzato F, de Leon S, Khanna VK, Weiler JE, O'Brien PJ, MacLennan DH. 1991. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* 253:448-451.
- Gerbens F, Verburg FJ, Van Moerkerk HT, Engel B, Buist W, Veerkamp JH, te Pas MF. 2001. Associations of heart and adipocyte fatty acid-binding protein gene expression with intramuscular fat content in pigs. *Journal of Animal Science* 79:347-354.
- Hedley PL, Jorgensen P, Schlamowitz S, Wangari R, Moolman-Smook J, Brink PA, Kanters JK, Corfield VA, Christiansen M. 2009. The genetic basis of long QT and short QT syndromes: A mutation update. *Human Mutation* 30:1486-1511.
- Jespersen T, Grunnet M, Olesen SP. 2005. The KCNQ1 potassium channel: From gene to physiological function. *Physiology (Bethesda)* 20:408-416.
- Park JW, Yun HM, Park JH, Lee IS, Kim IH. Effect of supplementation *Oreganum aetheroleum* essential oil on growth performance in sows and growth performance, fecal score in weanling pigs. *Korean Journal of Agricultural Science* 43:794-801. [in Korean]
- Kang YJ, Jeong DK, Cho IC, Han SH. 2016. Association between genotypes of the isocitrate dehydrogenase 3, beta subunit (IDH3B) gene and carcass traits in an F₂ crossbred population of Landrace × Jeju (Korea) Black pigs. *Journal of Life Science* 26:414-418.
- Kim GW, Kim HY. 2017. Effects of carcass weight and back-fat thickness on carcass properties of Korean native pigs. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* 37:385-391.
- Lander E, Kruglyak L. 1995. Genetic dissection of complex traits: Guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature Genetics* 11:241-247.
- Lee JB, Park HB, Yoo CK, Kim HS, Cho IC, Lim HT. 2017. Association of a missense mutation in the positional candidate gene glutamate receptor-interacting protein 1 with backfat thickness traits in pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 30:1081-1085.
- Lee KT, Byun MJ, Kang KS, Hwang H, Park EW, Kim JM, Kim TH, Lee SH. 2012. Single nucleotide polymorphism association study for backfat and intramuscular fat content in the region between SW2098 and SW1881 on pig chromosome 6. *Journal of Animal Science* 90:1081-1087.
- Li M, Chen L, Tian S, Lin Y, Tang Q, Zhou X, Li D, Yeung CKL, Che T, Jin L, Fu Y, Ma J, Wang X, Jiang A, Lan J, Pan Q, Liu Y, Luo Z, Guo Z, Liu H, Zhu L, Shuai S, Tang G, Zhao J, Jiang Y, Bai L, Zhang S, Mai M, Li C, Wang D, Gu Y, Wang G, Lu H, Li Y, Zhu H, Li Z, Li M, Gladyshev VN, Jiang Z, Zhao S, Wang J, Li R, Li X. 2017. Comprehensive variation discovery and recovery of missing sequence in the pig genome using multiple de novo assemblies. *Genome Research* 27:865-874.

- Li X, Kim SW, Do KT, Ha YK, Lee YM, Yoon SH, Kim HB, Kim JJ, Choi BH, Kim KS. 2011. Analyses of porcine public SNPs in coding-gene regions by re-sequencing and phenotypic association studies. *Molecular Biology Reports* 38:3805-3820.
- Okamura T, Yanobu-Takanashi R, Takeuchi F, Isono M, Akiyama K, Shimizu Y, Goto M, Liang YQ, Yamamoto K, Katsuya T, Fujioka A, Ohnaka K, Takayanagi R, Ogihara T, Yamori Y, Kato N. 2012. Deletion of CDKAL1 affects high-fat diet-induced fat accumulation and glucose-stimulated insulin secretion in mice, indicating relevance to diabetes. *PLoS One* 7:e49055.
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ, Sham PC. 2007. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics* 81:559-575.
- Ribani A, Bertolini F, Schiavo G, Scotti E, Utzeri VJ, Dall'Olio S, Trevisi P, Bosi P, Fontanesi L. 2017. Next generation semiconductor based sequencing of bitter taste receptor genes in different pig populations and association analysis using a selective DNA pool-seq approach. *Animal Genetics* 48:97-102.
- Ryan TA, Joiner BL. 1976. Normal probability plots and tests for normality. Minitab, State College, Pennsylvania, USA.
- Schiavo G, Dolezal MA, Scotti E, Bertolini F, Calo DG, Galimberti G, Russo V, Fontanesi L. 2014. Copy number variants in Italian large white pigs detected using high-density single nucleotide polymorphisms and their association with back fat thickness. *Animal Genetics* 45:745-749.
- Strucken EM, Schmitt AO, Bergfeld U, Jurke I, Reissmann M, Brockmann GA. 2014. Genomewide study and validation of markers associated with production traits in german landrace boars. *Journal of Animal Science* 92:1939-1944.
- Vaughan LK, Wiener HW, Aslibekyan S, Allison DB, Havel PJ, Stanhope KL, O'Brien DM, Hopkins SE, Lemas DJ, Boyer BB, Tiwari HK. 2015. Linkage and association analysis of obesity traits reveals novel loci and interactions with dietary n-3 fatty acids in an Alaska native (yup'ik) population. *Metabolism* 64:689-697.
- Wallner S, Grandl M, Konovalova T, Sigruner A, Kopf T, Peer M, Orso E, Liebisch G, Schmitz G. 2014. Monocyte to macrophage differentiation goes along with modulation of the plasmalogen pattern through transcriptional regulation. *PLoS One* 9:e94102.
- Yoo CK, Lim HT, Han SH, Lee SS, Ko MS, Kang T, Lee JH, Park HB, Cho IC. 2012. QTL analysis of back fat thickness and carcass pH in an F2 intercross between landrace and Korean native pigs. *Molecular Biology Reports* 39:8327-8333.
- Zhou X, Stephens M. 2012. Genome-wide efficient mixed-model analysis for association studies. *Nature Genetics* 44:821-824.