

能発達障害に特化したグループホームで、C県の単独事業）で生活することになった。支援の目標は、家族関係の改善と本人が自立して生活できることであった。

## 2. 経過

ホーム利用当初より対人トラブルが頻発した。人とのつき合い方、距離感がわからないことが原因であったため、適切な対人関係の取り方についての支援を行った。また、困ったときには相談できるということを伝え、実際に相談することで問題が解決できたという経験を積んでもらった。次第に、対人関係にいくつかの課題が残っているものの、本人の状態は安定していった。ホームで暮らすようになり、家族と距離を置くことで、家族にも余裕ができ、関係の改善がみられるようになった。

## 3. ホームを一人暮らしの準備のキーステーションとして

一人暮らしへの移行に伴い、仕事に影響が出ないよう、6カ月の移行期間を設けた。また、「一人暮らしと仕事との両立は難しい」との訴えに配慮したものであった。一人暮らしが軌道に乗ったところ、本人から「仕事と一人暮らしは両立できるものですね」という言葉が出てきた。一人暮らしに移行した後も定期的に訪問し、仕事のことや生活のことなど、本人の困りごと、気になることに對しての相談時間を設けた。

しかし、自ら運転する車で交通事故を起こしたことがきっかけとなって一人暮らしが立ち行かなくなった。自動車の修理代に関する金銭問題が発生したためである。家族との金銭問題の話し合いがうまくいかず、支援者も本人と家族の調整をうまくできなかったこともあり、家族関係も再び悪化した。本人はこれ以上一人暮らしを続けるのは難しいと感じていた。そして再びホームで生活す

ることとなり、あらためて家族関係の修復と一人暮らしに向けた取り組みを行うこととなった。

## IV 今後の課題

これまで、発達障害者の青年期の課題の多様性とその支援の在り方としての福祉的サービスの概要と支援の可能性について述べてきた。先にも述べた通り、発達障害の青年期の支援の課題は、彼らの障害特性や周囲の誤解などの問題もあり、これまで適切にサービスの提供を行えなかった部分も少なくない。これからは、福祉的サービスを積極的に用いることを通して、彼らの社会参加や社会自立に向けた支援の在り方を明確にする作業を行う時期とすべきであろう。そしてこれらの作業や実践から、さらに必要なサービスメニューについても議論を重ね、今後の新たな支援の在り方と可能性についても議論をはじめることが求められるよう。

### ▶ 文献

- 深津玲子 (2012) 青年期にある発達障害者の地域生活移行支援. 精神神経学雑誌 SS461-469.
- Havighurst RJ (1953) Human Development and Education. Longmans, Green & Co.
- 肥後祥治, 岸川朋子, 松田裕次郎, 浮貝明典, 国井一宏 (2013) 成人期の発達障害者に対する地域支援生活の実践における成果と課題. 厚生労働科学研究費補助金障害者対策総合研究事業「成人期以降の発達障害者の相談支援・住居空間・余暇に関する現状把握と生活適応に関する支援についての研究」(研究代表者辻井正次), pp.56-78.
- 前野哲哉 (2013) 障害者福祉施策における就労支援. In: 社会福祉士養成講座編集委員会 編: 新・社会福祉士養成講座 18. 就労支援サービス. 中央法規出版, pp.40-46.
- 辻井正次, 萩原拓, 鈴木勝昭, 野田航, 松本かおり (2013) 成人期以降の発達障害者の日常生活における支援ニーズおよび精神的健康状況に関する実態把握. 厚生労働科学研究費補助金障害者対策総合研究事業「成人期以降の発達障害者の相談支援・住居空間・余暇に関する現状把握と生活適応に関する支援についての研究」(研究代表者辻井正次), pp.16-55.

## 研究

と  
報告

## 日本版青年・成人感覚プロフィールの構成概念妥当性\*

自閉症サンプルに基づく検討

平島太郎 <sup>1)</sup>	伊藤大幸 <sup>2)</sup>	岩永竜一郎 <sup>3)</sup>	萩原 拓 <sup>4)</sup>
谷 伊織 <sup>5)</sup>	行廣隆次 <sup>6)</sup>	大西将史 <sup>7)</sup>	内山登紀夫 <sup>8)</sup>
小笠原恵 <sup>9)</sup>	黒田美保 <sup>10)</sup>	稲田尚子 <sup>11)</sup>	原 幸一 <sup>12)</sup>
井上雅彦 <sup>13)</sup>	村上 隆 <sup>14)</sup>	染木史緒 <sup>2, 15)</sup>	中村和彦 <sup>16)</sup>
杉山登志郎 <sup>17)</sup>	内田裕之 <sup>18)</sup>	市川宏伸 <sup>19)</sup>	辻井正次 <sup>14)</sup>

## 抄録

精神医学 56:123-132 2014

本研究では、感覚刺激に対する反応異常のアセスメントツールとして国際的に広く用いられている感覚プロフィールの日本版の標準化に関する研究の一環として、自閉症サンプル( $n=172$ )をもとに、日本版青年・成人感覚プロフィール(AASP-J)の妥当性を検討した。その結果、一般群とASD群との間で尺度得点に差異がみられた。また、保護者評定版の感覚プロフィールや日常生活への適応を阻害する不適応行動との関連が示され、尺度としての妥当性が確認された。ただし、知的障害やASD特性を抱える場合には、自己評定形式のAASP-Jに加え、他者評定形式の感覚プロフィールを実施し、客観的な視点から感覚異常を把握することの必要性も示唆された。

## Key words

Sensory profile, Scale development, ASD, Sensory processing

## はじめに

発達障害児者には感覚刺激に対する反応異常がみられることが多く、感覚の問題が生活上の諸問題と結びついている。しかし、発達障害児者の援

助をする上での感覚の問題への対応の重要性に反し、日本ではそれを的確にアセスメントするツールが不足していた。本論文では、感覚刺激に対する反応異常を評定する日本版青年・成人感覚プロフィール(the Japanese version of the Adoles-

2012年10月22日受稿, 2013年11月26日受理

\* Construct Validity of the Japanese Version of the Adolescent/Adult Sensory Profile in the Assessment of Individuals with Autism Spectrum Disorder

1) 名古屋大学大学院教育発達科学研究科(〒464-8601 愛知県名古屋市不老町), HIRASHIMA Taro: Graduate School of Education and Human Development, Nagoya University, Nagoya, Japan

2) 以下の著者所属, 英文表記は文末に掲載

0488-1281/14/¥500/論文/JCOPY

cent/Adult Sensory Profile ; AASP-J) の妥当性を検討した結果を報告する。

自閉症スペクトラム障害 (autism spectrum disorders ; ASD) 児は、感覚処理の問題を持つことが多く報告されている<sup>7,15)</sup>。さらに、感覚の問題は対人関係、情動、行動などにみられる問題と関係している。たとえば、高機能 ASD 児の感覚刺激に対する反応異常は、社会性の障害の重症度との間に有意な相関を示すことが報告されている<sup>9)</sup>。このように、発達障害児者の感覚の問題は学校や社会生活での適応に影響することが多い。

そのため、発達障害児者の持つ感覚の問題を把握し、対応を検討する必要がある。しかし、本邦ではそれを的確に評定するツールが不足していた。海外では、感覚刺激に対する反応の評定にはカンザス大学の Dunn W らによって開発された感覚プロフィール<sup>3,5,6)</sup>が用いられることが多い。感覚プロフィールは、発達障害をはじめとしたさまざまな障害や疾患によって生じる感覚異常を評定する質問紙式の検査である。この検査はアメリカで開発・標準化され、信頼性と妥当性が検証されている。感覚プロフィールには、対象児者の年齢に応じて、乳幼児用 (0~36 か月)、児童用 (3~10 歳用)、the Sensory Profile ; SP)、学校版 (3~11 歳用)、青年・成人用 (11 歳以上用)、の 4 バージョンが標準化されている。感覚プロフィールを活用すれば、発達障害児者の感覚刺激に対する反応異常についての信頼性のあるデータが収集でき、臨床・教育現場での指導、家族指導において重要な情報を提供することが可能になる。アメリカ精神医学会による精神疾患の診断・統計マニュアル第 5 版 (DSM-5) においても、ASD の診断基準に「知覚・感覚の異常」が新たに加えられた<sup>1)</sup>ことから、感覚刺激に対する反応異常を把握するツールの必要性は高い。本邦において、感覚プロフィールを再標準化し、実用化することは急務である。

これまで我々は、原著者との調整を重ね、AASP-J の開発と標準化を進めてきた。AASP-J の標準値および信頼性については梅田ら<sup>16)</sup>によって報告されている。本報告では、自閉症サンプル

に基づいて AASP-J の構成概念妥当性を検討した結果を示す。本研究の具体的な検討事項と予測は、以下の 4 点である。

1 点目に、AASP-J が ASD 児者の感覚処理の問題を捉えられているかを検討するために、ASD 群と一般群の尺度得点を比較する。ASD 児者の多くは感覚の問題を呈するため、ASD 群の AASP-J の得点は一般群よりも高くなると予測される。また、知的障害を合併する場合、感覚刺激への感情的・行動的反応の自己制御が困難さを増すため、一般群との差がより顕著になると考えられる。2 点目に、ASD 児者における知的能力 (IQ) および ASD 症状の程度と AASP-J の連続的な関連を検討する。上述の理由から、AASP-J は IQ との間に負の相関、ASD 症状との間に正の相関を示すと考えられる。3 点目に、保護者評定形式の日本版感覚プロフィール (the Japanese version of the Sensory Profile ; SP-J) を併せて実施し、自己評定形式の尺度である AASP-J の基準関連妥当性を検討する。AASP-J と SP-J の同じ象限同士は異なる象限よりも強い相関を示すと考えられる。4 点目に、日常の社会生活への適応と AASP-J の関連を検討する。感覚異常の問題は、適応に必要となる適応行動の習得を遅らせ、適応を阻害する不適応行動の生起を促進すると考えられるため、AASP-J は適応行動とは負の相関、不適応行動とは正の相関がみられると予測される。以上の観点から、AASP-J の構成概念妥当性を多角的に検証する。

## 方法

### 1. 対象

全国 28 都道府県の医療・心理・教育機関を受診し、熟練した精神科医により DSM-IV の診断基準に基づいて ASD (自閉性障害、アスペルガー障害または特定不能の広汎性発達障害) の診断を受けている 172 名が調査の対象となった。診断または IQ に基づき、知的障害のない ASD (high-functioning ASD ; HFASD) 群、知的障害のある ASD (low-functioning ASD ; LFASD) 群、知的

表 1. サンプルの内訳

	ASD 群										
	知的障害なし				知的障害あり			知的水準不明			
	男性	女性	不明	計	男性	女性	計	男性	女性	不明	計
<i>n</i>	48	6	1	55	21	6	27	70	19	1	90
平均年齢	14.5	12.5	17.0	14.4	15.5	17.8	16.0	19.6	19.6	29.0	19.7
(SD)	(3.5)	(2.1)	—	(3.4)	(3.4)	(5.2)	(3.9)	(6.6)	(6.0)	—	(6.5)
平均 IQ	103.5	96.8	93.0	102.6	52.8	43.6	50.9	—	—	—	—
(SD)	(14.7)	(12.4)	—	(14.5)	(15.6)	(15.8)	(15.8)	—	—	—	—

SD : standard deviation

ASD : autism spectrum disorders

水準不明 ASD 群の 3 群に対象者を分類した。各群の平均年齢・性別・平均 IQ の内訳は表 1 の通りである。ただし、欠損値は分析ごとに除外したため、分析によってデータ数は若干異なる。AASP-J については対象者本人に評定を求め、その他の尺度については、保護者、配偶者、兄弟、施設職員など、対象者をよく知る者に回答を求めた。

## 2. 調査内容

### 1) 日本版青年・成人版感覚プロフィール (AASP-J)

AASP-J は、11 歳以上を対象とする自己評定形式の尺度であり、60 項目から構成される。質問項目は味覚・嗅覚、運動、視覚、触覚、活動レベル、聴覚の 6 セクションからなる。スコアリングに際しては、低登録、感覚探究、感覚過敏、感覚回避の 4 象限ごとに集計・評価される。これら 4 象限は行動反応・自己制御の次元と神経学的閾値の次元によって区分され、積極的反応・高閾値が感覚探究 (e.g., 明るい場所や華やかな色彩の場所に行くのが好き)、消極的反応・低閾値が感覚過敏 (e.g., まわりが騒々しいと混乱してしまう)、消極的反応・高閾値が低登録 (e.g., 人が腕や背中に触っても、気付かないほうだ)、積極的反応・低閾値が感覚回避 (e.g., 騒がしいところには行かない) にそれぞれ対応する。各項目は日常の経験に対する反応を記述したもので、そのような反応を示す頻度を本人が 5 段階で回答する [1. ほとんどしない (5%), 2. まれに

(25%), 3. ときどき (50%), 4. しばしば (75%), 5. ほとんどいつも (95%)]。評定値が高いほど、反応の頻度が高いことを意味する。分析では、象限ごとに項目得点を合計した値を用いた。

日本版の開発にあたり、原版の AASP を翻訳し、バックトランスレーション手続きを経て原著者の承認を得た。また、原版の出版社であるピアソン社からも研究における AASP-J の使用許諾を得た。

### 2) 知能指数 (IQ)

回答者への聞き取りによって、ウェクスラー式またはビネー式知能検査による IQ の情報を得た。上記知能検査を受けた経験がない、または、正確な IQ 値について回答者の記憶がないもしくは曖昧なケースを除き、82 名 (45.1%) について IQ の情報が得られた。

### 3) 日本自閉症協会検討委員会版広汎性発達障害評定尺度 (PDD-Autism Society Japan Rating Scales ; PARS)

PARS<sup>13)</sup> は、ASD の把握とその困難度を評価するために、国内で開発・標準化された半構造化面接形式の尺度である。ASD 児者に特異的な行動を記述した項目で構成され、ASD の識別力や ASD アセスメントのゴールドスタンダードである ADI-R との関連などの観点から妥当性が確認されている<sup>11)</sup>。幼児期の最も症状が顕著だったときに関する回顧評定 (ピーク評定) と現在の症状に関する現在評定の 2 パターンがある。ピーク評定尺度については因子構造が検討されており、社

会的コミュニケーション(8項目), 過敏性・困難性(10項目), 常同行動(8項目), こだわり(8項目)の4下位尺度が見出されているため, 本研究ではピーク評定尺度を用いて AASP-J との関連を検討する。

PARS の項目は, ASD 児者に特徴的な行動特徴を記述したもので, 「なし(そのようなことはなかった/ない)」(0点), 「多少目立つ(多少そのようなことがあった/ある)」(1点), 「目立つ(よくそのようなことがあった/ある)」(2点)の3段階で評定を行う。高得点ほど, ASD 特性が顕著であることを意味する。

#### 4) 日本版感覚プロフィール(SP-J)

SP-J は, 原版では3~10歳の子どもを対象とする尺度であるが, 11歳以上に適用した場合でも尺度の信頼性が十分に高いことが確かめられている<sup>10)</sup>。また, ASD 特性を持つ人々を対象とした研究では, 年齢にかかわらず SP が実施される場合が多い。SP-J は日常の経験に対する反応を記述した125項目から構成され, 保護者が5段階で回答することによって評定される [1. しない(0%), 2. まれに(25%), 3. ときどき(50%), 4. しばしば(75%), 5. いつも(100%)]。評定値が高いほど頻度が高いことを意味する。SP-J のスコアリングシステムには, (1)理論的に想定される14セクション, (2)探索的主成分分析によって見出された9因子, (3)AASP-Jと同様の4象限, の3種類があるが, 本研究では, AASP-J との対応を検討するため, 4象限に基づくスコアリングを行った。

#### 5) Vineland-II 適応行動尺度 (Vineland Adaptive Behavior Scales, Second Edition ; Vineland-II)

Vineland-II<sup>14)</sup> は, さまざまな障害や疾患を抱える者の適応行動の発達や機能低下を評価するための半構造化面接形式の尺度である。知的障害・発達障害のアセスメントをはじめ, 国際的に幅広い研究・臨床の文脈で使用されている。本研究ではバックトランスレーションと約1,400名のサンプルによる標準化のプロセスを経て開発された日

本版 Vineland-II を使用した。日本版 Vineland-II は, 高い信頼性を持ち, 対象者の適応状況を正確に評価できることが明らかとなっている<sup>18)</sup>。

Vineland-II は全435項目からなり, 大きく適応行動尺度と不適応行動尺度の2つに分かれている。適応行動尺度は, 4領域(コミュニケーション, 日常生活スキル, 社会性, 運動スキル)から構成され, それぞれに2つから3つの下位領域が存在する。不適応行動尺度は, 不適応内在化, 不適応外在化, 不適応その他, 重要事項の4つの下位尺度からなるが, 数量的評価には前3者が用いられ, 重要事項については個別的な評価のみを行う。

Vineland-II の各項目は, 基本的に2, 1, 0の3段階で評価される。2点は対象者が手助けなしにその行動を習慣的に行っている場合に与えられる。1点はその行動の遂行に手助けが必要か, または時々行われている場合に与えられる。0点は, 対象者がその行動を滅多に行わないか, 全く行わないことを意味する。適応行動尺度は高得点ほど適応行動の習得が進んでいること, 不適応行動尺度は高得点ほど不適応行動の頻度が高いことを意味する。

#### 3. 倫理的側面への配慮

本研究の手続きは, 浜松医科大学医の倫理委員会の審査と承認を受けた。調査の実施にあたっては, 調査に参加しないことによる不利益が生じないことを明確に説明した上でインフォームドコンセントを得た。

#### 4. 分析

まず, 尺度が的確に発達障害者の感覚異常を捉えられているか否かを検討するため, 一般群と HFASD 群, LFASD 群の各象限の平均値を比較した。知的障害の有無が評定に影響する可能性が考えられたため, 知的水準不明 ASD 群については平均値の比較を行わなかった。この分析では, 一般群の11~17歳の平均値および標準偏差<sup>16)</sup>を一般母集団の値とみなし,  $z$  検定を行った。この分析により, 標本(臨床群)の平均値と母集団(一般群)の平均値の間に統計的な有意差があるかど

表 2 一般群と臨床群の比較

	一般群		HFASD 群				LFASD 群			
	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>z</i>	<i>d</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>z</i>	<i>d</i>
低登録	31.53	8.57	35.24	9.16	2.91**	0.43	34.14	9.61	1.43	0.30
感覚探求	38.34	8.98	33.51	9.28	-3.61***	-0.54	35.68	7.88	-1.39	-0.30
感覚過敏	33.01	9.11	35.71	10.36	1.99*	0.30	32.86	10.28	-0.07	34.26
感覚回避	32.96	9.23	34.87	10.06	1.39	0.21	32.32	10.31	-0.33	-0.07

\* $p < .05$ , \*\* $p < .01$ , \*\*\* $p < .001$ *M*: Mean, *SD*: standard deviation

HFASD: high-functioning autism spectrum disorders, LFASD: low-functioning autism spectrum disorders

表 3 AASP-J と IQ, PARS との相関係数

	IQ	PARS ピーク評定				
		社会性	敏感性	常同行動	こだわり	合計
低登録	-.11	.02	-.18	.15	.23	.05
感覚探求	-.14	-.07	-.07	.08	-.04	-.09
感覚過敏	.02	-.12	-.02	.20	.28	.14
感覚回避	.04	-.04	.07	.14	.22	.10

PARS: PDD Autism Society Japan Rating Scales

うかを検討できる。

次に、AASP-J の各象限と、SP および発達障害に関連する他の測度との相関係数を算出し、基準関連妥当性を検討した。発達障害に関する測度として本研究では、知的水準 (IQ)、ASD 症状 (PARS)、適応行動・不適応行動 (Vineland-II) を外在基準とし、AASP-J との関連を検討した。なお、この分析では、AASP-J と他の尺度との関連を、全体の傾向として把握することが目的であったため、臨床群のデータをまとめた上で分析を行った。

## 結果

### 1. 一般群と臨床群の比較

表 2 に HFASD 群と LFASD 群の象限ごとの平均値と *SD*、および *z* 値と効果量 *d* を示した。効果量 *d* は、群間の平均値の差に関する標準化された指標であり、慣習的な目安として、0.2 程度で小さい差、0.5 程度で中程度の差、0.8 程度で大きい差を示すとされる<sup>4)</sup>。*z* 検定の結果、HFASD 群では、感覚探求が一般群よりも低く、

低登録と感覚過敏は一般群よりも高かった。効果量 *d* の値は絶対値で 0.30~0.54 であり、小~中程度の群間差を示している。一方、LFASD 群においては、いずれの象限においても一般群との差がみられなかった。

### 2. IQ, PARS との関連

表 3 に AASP-J の各象限と IQ, PARS (ASD 症状) との相関係数を示した。AASP-J の各象限と IQ には有意な相関がみられなかった。同様に、PARS のいずれの下位尺度とも、有意な相関はみられなかった。

### 3. SP-J との関連

表 4 に AASP-J と SP-J の各象限の相関係数を示した。SP-J の低登録、感覚過敏、感覚回避と AASP-J の各象限との間には、.24~.45 と低~中程度の有意な正の相関がみられた。同一の象限同士では、.35~.39 の正の相関がみられた。また、AASP-J の感覚探求は、SP-J とは有意な相関がみられなかった。

### 4. Vineland-II との関連

続いて、表 5 に AASP-J の各象限と Vineland-

表 4 AASP-J と SP-J の相関係数

	SP-J			
	低登録	感覚探求	感覚過敏	感覚回避
AASP-J				
低登録	.36***	.45***	.28***	.35**
感覚探求	-.01	.13	-.02	.08
感覚過敏	.28**	.26**	.35***	.43***
感覚回避	.24**	.15	.30***	.39***

\* $p < .05$ , \*\* $p < .01$ , \*\*\* $p < .001$ 

AASP-J: The Japanese version of the Adolescents/Adults Sensory Profile, SP-J: The Japanese version of the Sensory Profile

表 5 AASP-J と Vineland-II との相関係数

	適応行動					不適応行動		
	コミュニ ケーション	日常生活 スキル	社会性	運動 スキル	適応行動 全体	不適応 内在化	不適応 外在化	不適応 全体
低登録	.13	.19	.08	.27 *	.20	.28 **	.37 ***	.37 ***
感覚探求	.14	.18	.19	.20	.21 *	-.12	.10	-.01
感覚過敏	.13	.15	.06	.12	.14	.33 **	.42 ***	.40 ***
感覚回避	-.01	-.01	-.04	-.08	-.04	.32 **	.40 ***	.36 ***

\* $p < .05$ , \*\* $p < .01$ , \*\*\* $p < .001$ 

II との相関を示した。適応行動尺度との関連では、低登録と運動スキル、感覚探求と適応行動全体との間に、有意ではあるが弱い正の相関を示しただけであった。不適応行動尺度との関連では、低登録、感覚過敏、感覚回避の 3 象限と不適応内在化・外在化との間に .28～.42 と、低～中程度の有意な相関がみられた。しかし、感覚探求は不適応尺度との間に関連がみられなかった。

## 考察

本研究では、発達障害児者の感覚刺激への反応異常を捉える尺度として国際的に広く利用されている AASP の日本版について、ASD を有する 172 名を対象とした調査データを基に、その妥当性を検討した。

一般群と臨床群の得点を比較した結果、HFASD 群は、低登録および感覚過敏において、予測と一致し、一般群よりも高い得点を示した。このことから、低登録および感覚過敏の 2 象限は ASD に伴う感覚異常の把握に有効であること

が明らかになった。ただし、差の大きさを示す  $d$  に着目すると、低登録で 0.43、感覚過敏で 0.30 と小～中程度の差となっており、保護者評定の SP-J (低登録で 1.69、感覚過敏で 0.78)<sup>9)</sup> に比較すると差が明確でない。一方、感覚探求では HFASD 群が一般群より低い得点を示した。保護者評定の SP では、感覚探求も他の象限と同じく、一般群より HFASD 群が高得点を示すという結果が得られているが、AASP-J では逆の結果が示された。AASP-J の感覚探求は、SP-J の感覚探求とは異なる特性を反映している可能性がある。SP-J の感覚探求は、「1 日中 1 人でぐるぐる回っていたりする」、「危険度を見せずに飛び降りたがる」、「やっていることの見移りが激しく、遊びにならない」といった項目で構成される。これらは、ASD の特徴である常同行動や、感覚刺激への過剰な反応といった不適応的な行動を表したものである。他方、AASP-J の感覚探求は、「身体を動かすのが好き」、「華やかな色の服を着るのが好き」、「人前で何かをするのが好き」といった、

一見すると、活動性が高く適応的である行動を表す項目によって構成されている。すなわち、AASP-J と SP-J の実質的な項目内容の違いにより、異なる結果が得られたと考えられる。

LFASD 群においては、予測に反し、いずれの象限も一般群との差がみられなかった。この結果は、対象者の知的水準が高い場合、ASD を有していても、ある程度感覚の問題を評定できるが、知的水準が低い場合、自己のモニタリングが困難となり、自己評定形式の AASP-J では適切に評定できない可能性を示唆する。また、評定前の段階で、尺度項目の意味を理解するのが困難であり、適切に回答が行われなかった可能性もある。この点については、対象者が自己評定を行う際、保護者やスタッフが質問文の理解を補助するといった、実施上の工夫を行っていく必要がある。

IQ および PARS (ASD 症状) との相関は、いずれの象限も有意な値を示さなかった。IQ との相関は、絶対値にして .02~.14 と弱く、上述の群間比較の結果とも一致し、知的水準が低い場合、自己評定形式の AASP-J の適用は困難であることが示唆された。PARS との相関は、感覚探究を除く 3 象限で、こだわり因子との相関が .22~.28、常同行動因子との相関が .14~.20、低登録と過敏性・困難性因子との相関が -.18 という一定の値を示しているが、サンプルサイズの不足によって統計的有意性は示されなかった。PARS は、ASD 症状を把握するのに特化したツールであるが、感覚の問題まで網羅しきれておらず、AASP-J との相関が低く出た可能性も考えられる。また、PARS の過敏性・困難性因子の項目は、「過去の嫌なことを思い出して、不安定になる」、「急に泣いたり怒ったりする」といった、幅広い感覚の問題とそれに伴う困難性を測定しているため、感覚の問題に特化した AASP-J との相関が低くなったと考えられる。さらに、PARS 得点は、保護者に対して、対象者の幼児期の最も症状が顕著だったときを回顧してもらったピーク評定によって得られたため、現在の状況についての自己評定を行う AASP-J 得点との相関が低くなった可能性

がある。以上の理由により、PARS の得点と AASP-J の得点間には、高い相関関係がみられなかったと考えられる。これらの点については、PARS の現在評定を用いるといった追試的な検討が必要である。

保護者評定である SP-J との関連を検討した結果、感覚探究を除いては、同一の象限の間で .35~.39 の相関がみられた。この結果は、一定程度、自己評定形式の AASP-J と保護者評定形式の SP-J による評定が一致することを示している。一般に、同一の概念の測定尺度であっても自己評定と保護者評定の相関は高くないことが知られている。たとえば、児童・青年の問題行動を測定する Strength and Difficulties Questionnaires では、同一下位尺度における自己評定と保護者評定の相関は .30~.42 にとどまっている<sup>8)</sup>。また、同じく問題行動の評定尺度である Child Behavior Checklist とその自己評定版である Youth Self Report でも、同一下位尺度における両者の相関は .22~.47 となっている<sup>17)</sup>。これらを考慮すると、本研究における感覚探究を除く 3 象限における .35~.39 という相関係数は、自己評定と保護者評定の相関としては標準的な水準にあり、一定の収束的妥当性が示されたと言える。感覚探究については、上述の群間比較でも保護者評定の SP-J と異なる結果が得られており、先に考察したように、AASP-J の感覚探究は、SP-J における感覚探究とは異なる概念を測定している可能性が高い。

また、Vineland-II の適応行動との関連は、低登録と運動スキル、感覚探究と適応行動全体が弱い正の相関を示した以外は、有意な相関がみられなかった。一方、Vineland-II の不適応行動との関連は、低登録、感覚過敏、感覚回避の 3 象限が、不適応内在化、不適応外在化、不適応全体のいずれとも中程度の負の相関を示した。以上の結果から、AASP-J によって捉えられる感覚の問題は、適応行動の習得を阻害するよりも、不適応行動の生起を促進する形で適応に悪影響を及ぼすことが示唆された。また、AASP-J が不適応の内化化、



外在化の両側面と関連を示したことから、感覚異常の問題が、抑うつ、不安、ひきこもりのような内在化問題から、攻撃、非行、反社会的行為のような外在化問題まで、広範な不適応問題のリスク要因となることが示唆された。

以上のように、AASP-J は ASD に伴う感覚異常の問題の把握に一定の有効性を持つことが示唆された。しかし、一般群と LFASD 群との間に差がみられなかったことや、IQ との相関がみられなかったことを考えると、知的障害を抱える対象者の場合、自己評定形式の AASP の適用は困難と考えられる。また、知的障害を持たない HFASD 群でも、保護者評定の SP<sup>®</sup>と比較すると、AASP-J における一般群との得点差は顕著でないことから、ASD 特性そのものが自己評定の妥当性に影響を及ぼしている可能性がある。したがって、ASD 児者の感覚異常の把握においては、自己評定形式の AASP-J に加えて他者評定形式の SP-J を実施して、客観的な視点からのアセスメントも同時に行う必要があると考えられる。

最後に今後の展望について述べる。第 1 に、ASD 以外の障害群を対象とした AASP-J の妥当性の検証が挙げられる。本研究では、感覚の問題が特に顕著であると考えられる ASD を有する者を対象とした。しかし、ASD だけでなく、注意欠如多動性障害 (attention deficit/hyperactivity disorder ; ADHD) 児でも、一般群よりも顕著な感覚処理の問題がみられることが分かっている<sup>12)</sup>。また、統合失調症の患者も、AASP の低登録、感覚探求、感覚回避の程度が一般群と異なることが報告されている<sup>2)</sup>。今後は、ASD に限らず、発達障害や精神障害といった障害群のデータを収集し、群間の得点の差異や障害特性との関連を検討することで、AASP-J の妥当性を検証する必要がある。第 2 に、AASP-J の臨床的応用の可能性が挙げられる。本研究により、AASP-J の一定の妥当性が示された。ASD 特性や知的障害が、自己評定の妥当性に影響を及ぼす可能性があるという課題は残るものの、感覚異常は、対象者の主観的な問題を含むため、他者評定式の尺

度だけでなく自己評定式の AASP-J を組み合わせて使用することが望ましい。支援の中で AASP-J を用い、対象者本人が知覚する困難さに積極的に焦点を当てることで、本人と周囲の他者との認識のずれや、対象者を取り巻く環境の感覚刺激を調整することに役立てることができると考えられる。今後は、臨床・教育現場で AASP-J を併用したアセスメントに基づき、発達障害児者の持つ個々のニーズに応じた、より効果的な支援の方策を立てるための実践的な検討を行っていく必要がある。

#### 付記

この研究は、厚生労働科学研究費補助金 (障害者対策総合研究事業 (精神障害分野)) 「発達障害者の適応評価尺度の開発に関する研究 (H21—ところ—一般—006)」 (主任 辻井正次) の成果の一部である。

#### 文献

- 1) American Psychiatric Association : Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-5. American Psychiatric Publishing, Arlington, 2013
- 2) Brown C, Cromwell RL, Filion D, et al : Sensory processing in schizophrenia : Missing and avoiding information. Schizophr Res 55 : 187-195, 2002
- 3) Brown CE, Dunn W : Adolescent/Adult Sensory Profile. Psychological Corporation, San Antonio, 2002
- 4) Cohen J : Statistical power analysis for the behavioral sciences. 2nd ed. Lawrence Erlbaum, Hillsdale, 1988
- 5) Dunn W : The Sensory Profile : User's Manual. Psychological Corporation, San Antonio, 1999
- 6) Dunn W : Infant/Toddler Sensory Profile. Psychological Corporation, San Antonio, 2002
- 7) Gomes E, Pedroso FS, Wagner MB : Auditory hypersensitivity in autistic spectrum disorder. Pro Fone 20 : 279-284, 2008
- 8) Goodman A, Lamping DL, Ploubidis GB : When to use broader internalising and externalizing subscales instead of the hypothesized five subscales on the strength and difficulties questionnaire (SDQ) : Data from British parents, teachers and children. J Abnorm Child Psychol 38 : 1179-1191, 2010

- 9) Hilton CL, Harper JD, Kueker RH, et al : Sensory responsiveness as a predictor of social severity in children with high functioning autism spectrum disorders. *J Autism and Dev Disord* 40 : 937-945, 2010
  - 10) 伊藤大幸, 平島太郎, 萩原拓他 : 日本版感覚プロフィールの標準化 : 信頼性および標準値の検討. *精神医学* 55 : 537-548, 2013
  - 11) Ito H, Tani I, Yukihiro R, et al : Validation of an Interview-Based Rating Scale Developed in Japan for pervasive developmental disorders. *Res in Autism Spectrum Disord* 6 : 1265-1272, 2012
  - 12) Mangeot SD, Miller LJ, McIntosh DN, et al : Sensory modulation dysfunction in children with attention-deficit-hyperactivity disorder. *Dev Med Child Neurol* 43 : 399-406, 2001
  - 13) PARS 委員会 : PARS (広汎性発達障害日本自閉症協会評定尺度). スペクトラム出版社, 2008
  - 14) Sparrow SS, Cicchetti DV, Balla DA : *Vineland Adaptive Behavior Scales. 2nd ed. Survey Forms Manual.* NCS Pearson Inc., Minneapolis, 2005
  - 15) Tomchek SD, Dunn W : Sensory processing in children with and without autism : A comparative study using the Short Sensory Profile. *Am J Occup Ther* 61 : 190-200, 2007
  - 16) 梅田亜沙子, 伊藤大幸, 岩永竜一郎, 他 : 日本版青年・成人感覚プロフィールの標準化 : 信頼性および標準値の検討. *臨床精神医学* 42 : 789-796, 2013
  - 17) Van Widenfelt BM, Goedhart AW, Treffers PD, et al : Dutch version of the Strengths and Difficulties Questionnaire (SDQ). *Eur Child Adolesc Psychiatry* 12 : 281-289, 2003
  - 18) 行廣隆次, 伊藤大幸, 谷伊織, 他 : 日本版 Vineland-II 適応行動尺度の開発—適応行動尺度の測定精度の検討. *精神医学* 55 : 627-635, 2013
- [2] 以下の筆者所属, 英文表記]
- 2) 浜松医科大学子どものこころの発達研究センター, ITO Hiroyuki, SOMEKI Fumio : Research Center for Child Mental Development, Hamamatsu University School of Medicine
  - 3) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科, IWANAGA Ryoichiro : Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
  - 4) 北海道教育大学旭川校, HAGIWARA Taku : Hokkaido University of Education Asahikawa Campus
  - 5) 東海学園大学人文学部, TANI Iori : Faculty of Humanities, Tokaigakuen University
  - 6) 京都学園大学人間文化学部, YUKIHIRO Ryoji : Faculty of Human and Cultural Studies, Kyoto Gakuen University
  - 7) 福井大学教育地域科学部, OHNISHI Masafumi : Faculty of Education and Regional Studies, University of Fukui
  - 8) 福島大学大学院人間発達文化研究科, UCHIYAMA Tokio : Faculty of Human Development and Culture, Fukushima University
  - 9) 東京学芸大学総合教育科学系, OGASAHARA Kei : School of Education, Tokyo Gakugei University
  - 10) 淑徳大学総合福祉学部, KURODA Miho : College of Integrated Human and Social Welfare Studies, Shukutoku University
  - 11) 国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所, INADA Naoko : National Institute of Mental Health, National Center of Neurology and Psychiatry
  - 12) 徳島大学大学院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部, HARA Koichi : Faculty of Integrated Arts and Sciences, University of Tokushima
  - 13) 鳥取大学医学系研究科, INOUE Masahiko : Graduate School of Medical Sciences, Tottori University
  - 14) 中京大学現代社会学部, MURAKAMI Takashi, TSUJII Masatsugu : School of Contemporary Sociology, Chukyo University
  - 15) ニューヨーク市立大学教育学部, Department of Education, City University of New York
  - 16) 浜松医科大学精神科, NAKAMURA Kazuhiko : Department of Psychiatry, Hamamatsu University School of Medicine
  - 17) 浜松医科大学児童青年期精神医学講座, SUGIYAMA Toshiro : Department of Child and Adolescent Psychiatry, Hamamatsu University School of Medicine
  - 18) 大阪大学大学院連合小児発達学研究科, UCHIDA Hiroyuki : United Graduate School of Child Development, Osaka University
  - 19) 東京都立小児総合医療センター, ICHIKAWA Hironobu : Tokyo Metropolitan Children's Medical Center

## Summary

Construct Validity of the Japanese Version of the

# Adolescent/Adult Sensory Profile in the Assessment of Individuals with Autism Spectrum Disorder

HIRASHIMA Taro<sup>1)</sup>, ITO Hiroyuki<sup>2)</sup>  
 IWANAGA Ryoichiro<sup>3)</sup>, HAGIWARA Taku<sup>4)</sup>  
 TANI Iori<sup>5)</sup>, YUKIHIRO Ryoji<sup>6)</sup>  
 OHNISHI Masafumi<sup>7)</sup>, UCHIYAMA Tokio<sup>8)</sup>  
 OGASAHARA Kei<sup>9)</sup>, KURODA Miho<sup>10)</sup>  
 INADA Naoko<sup>11)</sup>, HARA Koichi<sup>12)</sup>  
 INOUE Masahiko<sup>13)</sup>, MURAKAMI Takashi<sup>14)</sup>  
 SOMEKI Fumio<sup>2,15)</sup>, NAKAMURA Kazuhiko<sup>16)</sup>  
 SUGIYAMA Toshiro<sup>17)</sup>, UCHIDA Hiroyuki<sup>18)</sup>  
 ICHIKAWA Hironobu<sup>19)</sup>, TSUJII Masatsugu<sup>14)</sup>

As part of a series of studies on the standardization and validation of the Japanese Version of the Adolescent/Adult Sensory Profile (AASP-J), we examined its construct validity by using data from 172 Japanese individuals with autism spectrum disorder (ASD). We conducted two types of analyses: (1) a comparison of the AASP-J scores between normally developing individuals and those with ASD; and (2) an examination of the criteria-related validity of the AASP-J with other ASD scales. The results revealed the following: (1) the scale scores identified a difference between normally developing individuals and those with ASD; (2) the AASP-J self-rating scores were moderately correlated with the parent-rating version of the Sensory Profile scores; and (3) the AASP-J scores were positively correlated with the maladaptive behavior scores, as measured using the Vineland-II adaptive scale. These results confirmed the high validity of the AASP-J and led to a discussion of the

clinical utility of the AASP-J.

- 1) Graduate School of Education and Human Development, Nagoya University, Nagoya, Japan
- 2) Research Center for Child Mental Development, Hamamatsu University School of Medicine
- 3) Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
- 4) Hokkaido University of Education Asahikawa Campus
- 5) Faculty of Humanities, Tokaigakuen University
- 6) Faculty of Human and Cultural Studies, Kyoto Gakuen University
- 7) Faculty of Education and Regional Studies, University of Fukui
- 8) Faculty of Human Development and Culture, Fukushima University
- 9) School of Education, Tokyo Gakugei University
- 10) College of Integrated Human and Social Welfare Studies, Shukutoku University
- 11) National Institute of Mental Health, National Center of Neurology and Psychiatry
- 12) Faculty of Integrated Arts and Sciences, University of Tokushima
- 13) Graduate School of Medical Sciences, Tottori University
- 14) School of Contemporary Sociology, Chukyo University
- 15) Department of Education, City University of New York
- 16) Department of Psychiatry, Hamamatsu University School of Medicine
- 17) Department of Child and Adolescent Psychiatry, Hamamatsu University School of Medicine
- 18) United Graduate School of Child Development, Osaka University
- 19) Tokyo Metropolitan Children's Medical Center

RESEARCH

Open Access

# *N*-ethylmaleimide-sensitive factor interacts with the serotonin transporter and modulates its trafficking: implications for pathophysiology in autism

Keiko Iwata<sup>1,2</sup>, Hideo Matsuzaki<sup>1,2,3\*</sup>, Taro Tachibana<sup>4</sup>, Koji Ohno<sup>5</sup>, Saori Yoshimura<sup>4</sup>, Hironori Takamura<sup>6,7</sup>, Kohei Yamada<sup>6,7</sup>, Shinsuke Matsuzaki<sup>6</sup>, Kazuhiko Nakamura<sup>8</sup>, Kenji J Tsuchiya<sup>3</sup>, Kaori Matsumoto<sup>3</sup>, Masatsugu Tsujii<sup>3,9</sup>, Toshiro Sugiyama<sup>10</sup>, Taiichi Katayama<sup>6\*</sup> and Norio Mori<sup>3,8</sup>

## Abstract

**Background:** Changes in serotonin transporter (SERT) function have been implicated in autism. SERT function is influenced by the number of transporter molecules present at the cell surface, which is regulated by various cellular mechanisms including interactions with other proteins. Thus, we searched for novel SERT-binding proteins and investigated whether the expression of one such protein was affected in subjects with autism.

**Methods:** Novel SERT-binding proteins were examined by a pull-down system. Alterations of SERT function and membrane expression upon knockdown of the novel SERT-binding protein were studied in HEK293-hSERT cells. Endogenous interaction of SERT with the protein was evaluated in mouse brains. Alterations in the mRNA expression of SERT (SLC6A4) and the SERT-binding protein in the post-mortem brains and the lymphocytes of autism patients were compared to nonclinical controls.

**Results:** *N*-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) was identified as a novel SERT-binding protein. NSF was co-localized with SERT at the plasma membrane, and NSF knockdown resulted in decreased SERT expression at the cell membranes and decreased SERT uptake function. NSF was endogenously co-localized with SERT and interacted with SERT. While *SLC6A4* expression was not significantly changed, *NSF* expression tended to be reduced in post-mortem brains, and was significantly reduced in lymphocytes of autistic subjects, which correlated with the severity of the clinical symptoms.

**Conclusions:** These data clearly show that NSF interacts with SERT under physiological conditions and is required for SERT membrane trafficking and uptake function. A possible role for NSF in the pathophysiology of autism through modulation of SERT trafficking, is suggested.

**Keywords:** Serotonin transporter, NSF, Interaction, Membrane trafficking, Autism, Post-mortem brain, Lymphocyte

\* Correspondence: [matsuzah@u-fukui.ac.jp](mailto:matsuzah@u-fukui.ac.jp); [katayama@ugscd.osaka-u.ac.jp](mailto:katayama@ugscd.osaka-u.ac.jp)

<sup>1</sup>Research Center for Child Mental Development, University of Fukui, Fukui, Japan

<sup>6</sup>Department of Molecular Brain Science, United Graduate School of Child Development, Osaka University, Kanazawa University, Hamamatsu University School of Medicine, Chiba University and University of Fukui, Suita, Osaka, Japan

Full list of author information is available at the end of the article

## Background

Autism is a pervasive developmental disorder characterized by severe and sustained impairment of social interaction and communication, and restricted or stereotyped patterns of behavior and interest. Many studies on the pathophysiological mechanisms of autism have focused on the serotonergic system. Prior studies have consistently found elevated serotonin levels in the whole blood cells and platelets of autism patients [1-5] and their relatives [6-8]. Short-term dietary depletion of tryptophan (the precursor of serotonin) has been shown to exacerbate repetitive behavior and to elevate anxiety and feelings of unhappiness in autistic adults [9]. Accordingly, many genetic studies have examined the associations between autism and genetic mutations of human serotonin transporter (SERT; solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 4 (*SLC6A4*)), especially the short allele of a polymorphism in the promoter region of the serotonin transporter gene. Although some positive relationships have been found, the results to date are inconsistent [10-15]. A single photon emission computed tomography study showed that autistic children, under light sedation, exhibit a reduction in SERT binding in the medial frontal cortex, midbrain and temporal lobe areas [16]. Importantly, our colleagues recently reported that binding of SERT and its radioligand was significantly lower throughout the brain in autistic individuals compared with controls [17]. The reduction in the anterior and posterior cingulate cortices was associated with an impairment of social cognition in autistic subjects, and a significant correlation was also found between repetitive and/or obsessive behavior and interests and a reduction in SERT binding in the thalamus [17]. These results suggested that SERT protein levels and/or its transport capacity were decreased in the brains of autistic patients. Despite this prediction, Azmitia and colleagues reported increased immunoreactivity to a SERT antibody of serotonin axons in the post-mortem cortices of autism patients [18].

SERT is an integral plasma membrane glycoprotein that regulates neurotransmission through the reuptake of 5-hydroxytryptamine (5-HT), also known as serotonin, from the synaptic cleft. SERT transport capacity is known to be regulated through mechanisms that involve subcellular redistribution of the transporter, which are regulated by various cellular mechanisms, including interactions with other proteins [19,20]. Indeed, several SERT-binding proteins have been reported. Syntaxin-1A [21-23] and secretory carrier membrane protein 2 (SCAMP2) have been reported to be associated with the N-terminal tail of SERT [24]. Macrophage myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MacMARCKS) [25], integrin  $\beta 3$  [26] and nitric oxide synthase (nNOS) [27] have been reported to be associated with the C-terminal tail of SERT. SERT also forms complexes with hydrogen peroxide-inducible clone

5 protein (Hic-5) [28,29], phosphatase 2A (PP2A) [30], and  $\alpha$ - and  $\gamma$ -synuclein [31,32]. By interacting with SERT, SCAMP2, MacMARCKS, nNOS, Hic-5, PP2A and  $\alpha/\gamma$ -synuclein reduce the efficacy of serotonin reuptake because of a reduction in surface expression of SERT or promotion of SERT dephosphorylation [24,25,27,29-32]. Loss of integrin  $\beta 3$  results in decreased SERT function and surface expression in platelets [26]. Syntaxin-1A regulates the electrophysiological properties of SERT [23].

In this study, we sought to identify novel proteins interacting with the N- and C-terminal portions of SERT, and which thereby regulate SERT function. We also measured the levels of mRNAs for SERT and SERT-interacting proteins in post-mortem brains and lymphocytes from autism patients to assess their involvement in autism.

## Methods

### Animal experiments

Experiments using mice were approved by the Committee on Animal Research of Hamamatsu University School of Medicine and University of Fukui. These experiments were performed in accordance with the Guide for Animal Experimentation at the Hamamatsu University School of Medicine and the University of Fukui.

### Glutathione S-transferase pull-down assays

Full-length rat SERT complementary DNA (cDNA) was obtained from Dr Heinrich Betz (Max Planck Institute) [25,33]. PCR fragments corresponding to the N-terminal domain of the rat SERT (N-SERT; residues 1 to 85 amino acids) and the C-terminal domain of the rat SERT (C-SERT; residues 595 to 630 amino acids) were fused to glutathione S-transferase (GST) by subcloning into the pGEX-5X-1 bacterial expression vector (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden), to produce vectors containing GST-N-SERT and GST-C-SERT. Plasmids were transformed into *Escherichia coli* (BL21 (DE3), Stratagene, La Jolla, CA, USA) and were cultured and induced with isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) at 37°C for 4 h. Mouse brain tissue was homogenized on ice using a homogenizer (Iuchi, Osaka, Japan), in 5 ml of homogenization buffer (50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 40 mM Tris-HCl pH 8.0) supplemented with a 1 $\times$  complete protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) per brain. The same amount of extraction buffer (20 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% NP-40, 1% deoxycholate) was added, and homogenates were incubated at 4°C for 30 min with rotation. Insoluble cellular debris was removed by centrifugation, and the supernatants were collected. Then, the extracts were diluted up to tenfold in homogenization buffer plus extraction buffer without detergents. Extracts were incubated with glutathione agarose bound to GST, GST-N-SERT or GST-C-SERT at 4°C for 3 h. Beads were washed five times with TBS buffer (50 mM Tris-HCl

pH 7.4, 150 mM NaCl and 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid) and boiled in SDS-PAGE sample buffer for 5 min to elute bound proteins. These samples were subjected to SDS-PAGE, which was followed by silver staining using a Silver Stain MS Kit (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan) to visualize protein bands for mass spectrometry analysis. The samples were also used for Western blotting experiments.

#### Western blot analysis

Western blotting was performed following a previously published protocol [34]. Antibodies against SERT (1:400 to 2,000; C-20, Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA, USA), *N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF; 1:500; Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA, USA), syntaxin-1A (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA, USA) or  $\beta$ -actin (1:1,000; Abcam Inc, Cambridge, MA, USA) were used. Immunoreactive bands were scanned and quantified using ImageJ software (ImageJ 1.44, National Institutes of Health, USA).

#### In-gel digestion and mass spectrometry analysis

Protein bands were excised from SDS-polyacrylamide gels. The bands were processed in destaining solutions included in the Silver Stain MS Kit. Disulfide bonds were reduced with dithiothreitol (DTT) and the proteins were alkylated with iodoacetamide. The proteins were then treated with 50  $\mu$ l (25 ng/ $\mu$ l) of Trypsin Gold (Promega, Madison, WI, USA) in 50 mM ammonium bicarbonate for 45 min on ice, and then overnight at 37°C. After enzymatic digestion, the peptides were eluted from the gel by treatment (twice, for 30 min each time) with 50  $\mu$ l of a mixture containing 50% acetonitrile and 5% trifluoroacetic acid. The two eluates were pooled and evaporated to dryness in a vacuum centrifuge. Prior to mass spectrometric analysis, peptides were re-dissolved in 50  $\mu$ l of 0.1% formic acid. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) of the peptide mixtures was performed on a QSTAR XL (ESI-QqTOF; AB Sciex, Foster City, CA, USA) mass spectrometer. Product ion (MS/MS) spectra of the peptides separated by high-performance liquid chromatography (HPLC) were recorded and then submitted to the Mascot database search engine (Matrix Science [35]) for protein identification. The SwissProt database was used with 'all entries' for taxonomy. The tolerance was  $\pm 0.1$  Da, and only one error was considered for the enzyme's cutoff point.

#### Production of a stable cell line (HEK293-hSERT cells)

The human SERT (hSERT) protein was transcribed from the human *SERT* gene. The cDNA for hSERT was isolated by RT-PCR. The PCR fragments were cloned into pcDNA3.1(+) (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) resulting in the construct pcDNA-hSERT. To generate stably

transfected cells, pcDNA-hSERT was transfected into the human embryonic kidney cell line HEK293 using Transfectamine 2000 (Invitrogen) in accordance with the manufacturer's instructions. After 24 h, transfected cells were switched to a medium containing 1 mg/ml geneticin (G418); 1 week later, resistant colonies were isolated from culture plates using sterile clone rings. Individual cells were used to generate clonal lines. Multiple lines tested positive for immunostaining using SERT Ab (Santa Cruz Biotechnology, Inc) and a fluorescence-based uptake assay, and clonal line #7 (termed HEK293-hSERT cells) was used in all experiments reported here. The HEK293-hSERT cells were cultured in DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100  $\mu$ g/ml) and G418 (0.2 mg/ml) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>.

#### Primary culture of serotonergic raphe neurons

Primary culturing of serotonergic raphe neurons was performed using mouse neurons as described previously [36]. Pregnant BL6 mice (E16.5) were euthanized by cervical dislocation. Embryos were removed and placed in Hank's balanced salt solution (HBSS) without Ca<sup>2+</sup> (Life Technologies Co, Carlsbad, CA, USA). Rostral raphe neurons were dissected from the midbrain according to a method described previously [37]. Briefly, heads were removed from the embryos under a dissecting microscope (SMZ645; Nikon, Tokyo, Japan), and the midbrain/brainstem was gently dissociated. The neural tube was opened ventrally and flattened in a Petri dish containing HBSS without Ca<sup>2+</sup>. A strip of tissue of approximately 0.5 mm in width was dissected at the midline of the rostral rhombencephalon. Raphe tissue was resuspended in 5 ml of HBSS without Ca<sup>2+</sup> and triturated ten times; the homogenate was strained through a cell strainer (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) to remove debris, and an equal amount of HBSS containing Ca<sup>2+</sup> was added. Cells were centrifuged (500 g, 5 min), and the pellet was resuspended in 5 ml of Neurobasal media (Invitrogen) containing B27 supplement (Invitrogen), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100  $\mu$ g/ml), and 0.4% L-Glutamine (Invitrogen) and plated onto eight-well slide chambers coated with poly-D-lysine (BD Biosciences). Two days after plating, 0.3 ml of medium from each well was replaced with fresh medium. Cells were cultured for 7 days *in vitro* [36].

#### siRNA-mediated gene knockdown

The duplexed oligonucleotides of siRNA used in this study were based on the sequence of the human cDNA encoding *NSF*. *NSF* siRNAs and a non-silencing control siRNA were obtained from Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA). The targeted sequences of the human *NSF* siRNAs were as follows: 5'-GGAATGCAA TAAAGAGTAAATATAC-3' (siRNA-1) and 5'-GGATAG

GAATCAAGAAGTTACTAAT-3' (siRNA-2). Transfection was performed using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) in accordance with the manufacturer's instructions, and cells were processed 48 h after transfection.

#### Immunocytochemistry and microscopy

HEK293-hSERT cells were grown on poly-D-lysine-coated glass coverslips. Raphe neurons were plated onto eight-well slide chambers coated with poly-D-lysine (BD Biosciences) and cultured for 7 days *in vitro* [36]. Cells were washed with PBS (-) and fixed with 2% paraformaldehyde in PBS (-), pH 7.4, for 15 min at room temperature (RT). Cells were washed with PBS (-) and incubated with ice cold 100% methanol for 10 min at -20°C to permeabilize them. Cells were washed with PBS (-) and incubated with blocking solution (5% skimmed milk in PBS (-)) at RT for 1 h followed by incubation with primary antibody against SERT (1:400; C-20, Santa Cruz Biotechnology, Inc), NSF (1:500; Cell Signaling Technology, Inc), cadherin (1:50; Abcam Inc, Cambridge, MA, USA) or serotonin (1:50; Gene Tex, Inc, Irvine, CA, USA) diluted in 1% skimmed milk in PBS (-) for 2 h at RT. Cells were washed in PBS (-) and incubated with the appropriate fluorophore-conjugated secondary antibody diluted in 1% skimmed milk in PBS for 60 min at RT. After washing, the cells were mounted onto microscope slides in 50% glycerol in PBS (-). Samples were imaged on a fluorescence microscope (BX53; Olympus, Tokyo, Japan) or a laser scanning confocal microscope (FluoView FV1000; Olympus).

#### Fluorescence-based uptake assay

The fluorescence-based uptake assay employed a fluorescent substrate that mimics the biogenic amine neurotransmitters and is taken up by the cell through their specific transporters, resulting in increased fluorescence intensity [38]. The corresponding fluorescence-based potencies (FL pIC<sub>50</sub> values) were determined in a similar manner to the [<sup>3</sup>H]-neurotransmitter uptake protocols [39]. HEK293-hSERT cells were plated in black, 96-well optical bottom assay plates coated with poly-D-lysine (#3882, Corning Life Sciences, Lowell, MA, USA) and transfected with siRNAs as described above. Fluorescent substrate uptake assays were performed using the Neurotransmitter Transporter Uptake Assay Kit (Molecular Devices Co, Sunnyvale, CA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. Kinetic measurements of relative fluorescence units (integrated over 0.5 ms) were made using a cycle time of 5 min in a fluorescence microplate reader (SpectraMax M5; Molecular Devices Co). Data were normalized to cell number using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay described below. Non-specific uptake

was determined in the presence of 10 μM fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor.

#### MTT assay

Cell proliferation was measured with a MTT assay. Cells were incubated with MTT solution at 37 °C for 6 h. Following removal of the solution, dimethyl sulfoxide was added, and the amount of formazan formed was measured spectrophotometrically at 550 nm using a microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

#### Biotinylation

Biotinylation experiments were performed using the Cell Surface Protein Isolation Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. The cells were incubated with sulfo-NHS-SS-biotin solution for 30 min at 4°C, and the biotinylation of membrane proteins was stopped by adding quenching solution. The cells were washed and lysed in lysis buffer containing 1× complete protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science). Cell lysates were incubated with NeutrAvidin Agarose beads for 1 h at RT. Beads were washed and biotinylated proteins were eluted using SDS-PAGE sample buffer. Analysis was performed on aliquots taken: (a) prior to incubation with beads (as total lysate) and (b) of the bead elute (as the biotinylated membrane fraction). Then, immunoblot analysis was carried out as described above. Analysis was performed on aliquots taken: (a) prior to incubation with beads (as total lysate) and (b) of the bead elute (as the biotinylated membrane fraction). Then, Western blot analysis was carried out as described above. For the biotinylated membrane fraction, after Western blot analysis, the membrane was stained with Coomassie Brilliant Blue (CBB) as a protein-loading control.

#### Time-controlled transcardiac perfusion cross-linking and immunoprecipitation

The time-controlled transcardiac perfusion cross-linking (tcTPC) experiments were performed as described previously [40]. Mice were anesthetized and perfused with saline at 25 ml/min for 2 min to purge the blood vessels. The perfusate was switched to fixative solution (4% formaldehyde in PBS (-)) at 25 ml/min and cross-linking was carried out for 6 min. After perfusion, brains were rapidly removed from the skull, postfixed in tcTPC reagent and immediately frozen by immersion in liquid nitrogen. The perfusion and postfixing procedures were completed within 15 min. Mouse brains were homogenized on ice using a homogenizer (Iuchi, Osaka, Japan), in 5 ml of homogenization buffer (50 mM NH<sub>4</sub>Cl, 40 mM Tris-HCl, pH 8.0) supplemented with 1× complete protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science) per brain. The same amount of extraction buffer (20 mM NaCl,

20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1% NP-40, 1% deoxycholate) was added, followed by incubation at 4°C for 30 min with rotation. Insoluble cellular debris was removed by centrifugation (3,000 rpm, 10 min), and the supernatants were then used as a brain extract. Brain extracts were pre-cleared with 30 µl of protein G-Sepharose (Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham, MA, USA) for 1 h at 4°C. Cleared lysates were first incubated with an anti-SERT antibody (made by two of the authors, TT and SY) at 4°C for 3 h, and then with 20 µl of protein G-Sepharose for 1 h at RT. The complex-bound resin was washed five times with IP buffer (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl; pH 7.2). Immunoprecipitated complexes were boiled in 2× SDS-PAGE sample buffer for 5 min to elute bound proteins. Western blot analysis was carried out as described above.

### Post-mortem brain tissues

The ethics committee of the Hamamatsu University School of Medicine approved this study. The Autism Tissue Program (Princeton, NJ, USA) [41], the National Institute of Child Health and Human Development's Brain and Tissue Bank for Developmental Disorders (Baltimore, MD, USA) [42] and the Harvard Brain Tissue Resource Center (Belmont, MD, USA) [43] provided frozen post-mortem brain tissues from dorsal raphe regions ( $n = 11$  control and  $n = 7$  autism).

### Lymphocyte samples

The participants in this study were 30 male subjects with autism spectrum disorder (ASD) and 30 healthy male controls. All participants were Japanese. They were born and lived in restricted areas of central Japan, including Aichi, Gifu and Shizuoka prefectures. Based on interviews and available information, including hospital records, diagnoses of ASD were made by an experienced child psychiatrist (TS) based on the DSM-IV-TR criteria. The Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R) [44] was also conducted by two of the authors (KJT and KM), both of whom have established reliability for diagnosing autism with the Japanese version of the ADI-R. The ADI-R is a semi-structured interview conducted with a parent, usually the mother, and is used to confirm the diagnosis and also to evaluate the core symptoms of ASD. The ADI-R domain A score quantifies impairment in social interaction, the domain BV score quantifies impairment in communication, and the domain C score quantifies restricted, repetitive and stereotyped patterns of behavior and interests. The ADI-R domain D corresponds to the age of onset criterion for autistic disorder. The manual for the Wechsler Intelligence Scale for Children, Third Edition [45], was used to evaluate the intelligence quotient (IQ) of all the participants. Comorbid psychiatric illnesses were excluded by means of the Structured Clinical Interview for DSM-IV (SCID).

Participants were excluded from the study if they had any symptoms of inflammation, a diagnosis of fragile X syndrome, epileptic seizures, obsessive-compulsive disorder, affective disorders or any additional psychiatric or neurological diagnoses. None of the participants had ever received psychoactive medications before this study. Healthy control subjects were recruited locally by advertisement. All control subjects underwent a comprehensive assessment of their medical history to eliminate individuals with any neurological or other medical disorders. SCIDs were also conducted to identify any personal or family history of past or present mental illness. None of the comparison subjects initially recruited was found to fulfill any of these exclusion criteria.

This study was approved by the ethics committee of the Hamamatsu University School of Medicine. All participants as well as their guardians were given a complete description of the study, and provided written informed consent before enrollment. Whole-blood samples were collected by venipuncture from all participants. Lymphocytes were isolated from blood samples by means of the Ficoll-Paque gradient method (purity 80%) within 2 h after sampling.

### Quantitative real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction

Total RNA was isolated from the dorsal raphe regions of post-mortem brains and lymphocytes using TRIZOL reagent (Invitrogen). The RNA samples were further purified using the RNeasy Micro Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). First-strand cDNA was synthesized from the RNA samples using the SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen). Quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis was performed using the TaqMan method in the ABI StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). TaqMan assay IDs of the genes are as follows: *SLC6A4*, Hs00984349\_m1 and *NSF*, Hs00938040\_m1. *Actin, beta* (*ACTB*; Hs99999903\_m1) was used as the endogenous reference. Relative quantification of *NSF* and *SERT* expression levels in post-mortem brains was performed using the delta-delta  $C_T$  method [46], with the constitutively expressed gene *ACTB* as an internal control. Standard curves were constructed for *NSF*, *SERT* and *ACTB* primers to validate the application of the delta-delta  $C_T$  method. Relative quantification of *NSF* and *SERT* expression levels in lymphocytes was performed using the relative standard curve method, with the constitutively expressed gene *ACTB* as an internal control.

### Statistical analysis

The data were analyzed using a two-tailed unpaired *t*-test after it had been confirmed that there were no statistically significant differences in variance as assessed by the *F* test.



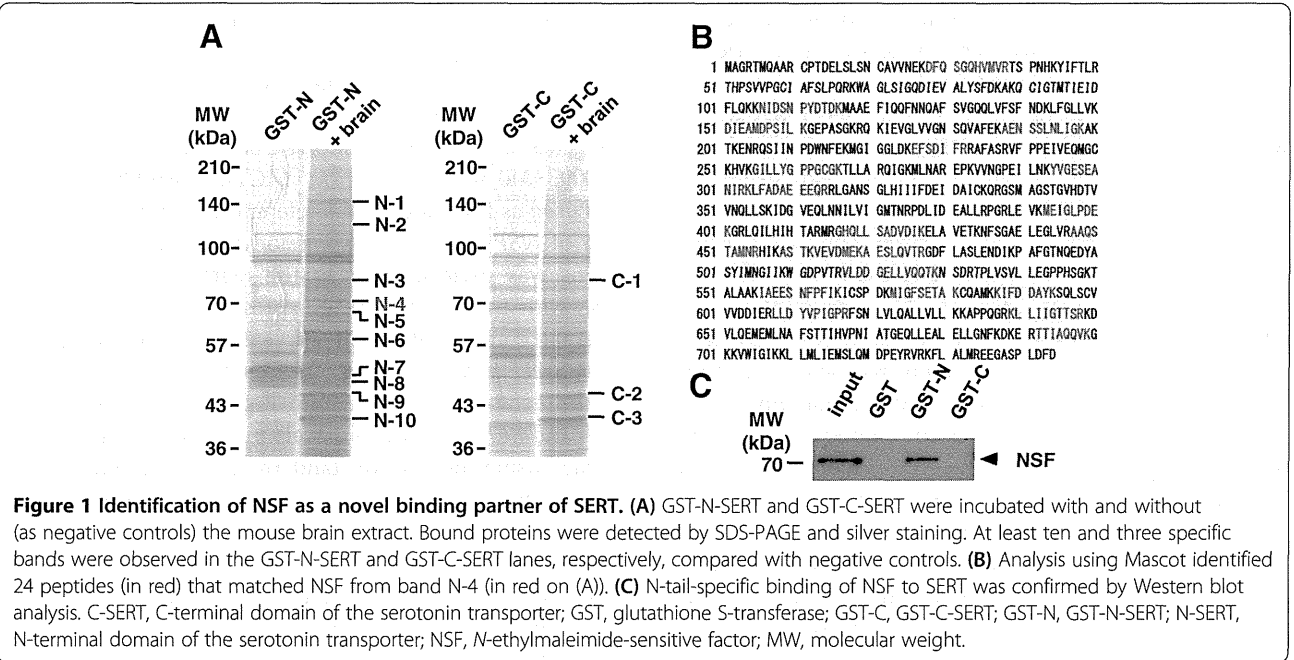
One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's correction was used for multiple comparisons. One-way repeated-measures ANOVA with Tukey's *post hoc* test was used for analysis of data from the uptake assay. The Mann-Whitney *U* test was used to evaluate differences in age, post-mortem interval (PMI) and IQs between the autism and control groups, and gene expression levels in the post-mortem brains and lymphocytes between these groups. Fisher's exact test was used to evaluate differences in race and gender between the autism and control groups. Evaluation of the relationships between *NSF* expression level and clinical variables and symptom profiles was performed using Spearman's rank correlation coefficient. *P* values of less than 0.05 were considered to indicate statistical significance. All statistical analyses were performed using statistical analysis software (SPSS, version 12.0 J, IBM, Armonk, NY, USA).

## Results

### Identification of *N*-ethylmaleimide-sensitive factor as a novel serotonin transporter-binding protein

To identify novel binding proteins for SERT, we conducted pull-down experiments using GST-N-SERT or GST-C-SERT with and without (as a negative control) mouse brain lysates. After SDS-PAGE and silver staining of the gels, at least ten specific bands were observed in the lane containing proteins eluted from GST-N-SERT beads incubated with brain lysates, and at least three bands were observed in the lane containing proteins eluted from GST-C-SERT beads incubated with brain

lysates (Figure 1A). The protein bands were excised from the gel and subjected to in-gel trypsin digestion. The tryptic peptide mixtures were analyzed by mass spectrometry. Excluding proteins that bound to both termini of SERT, we identified seven N-terminal-specific binding proteins, but no C-terminal-specific binding proteins (Table 1). One of the N-terminal specific bands, migrating at around 70 kDa, N-4 (Figure 1A), was identified as NSF, which regulates membrane fusion events [47,48], based on 24 independent MS spectra (Figure 1B and Table 1). We focused on the interaction between NSF and SERT in the present study for the following reasons. First, we identified NSF as having the highest reliability score (Table 1). Second, NSF interacts with neurotransmitter receptors, such as AMPA,  $\beta_2$  adrenergic and GABA<sub>A</sub> receptors, and it regulates the membrane trafficking and synaptic stabilization of these receptors [49-57]. Finally, in the photoreceptor synapse, the NSF and Arrestin 1 interaction regulates expression of vesicular glutamate transporter 1 and excitatory amino acid transporter 5 in the photoreceptor synapse [58]. These findings suggest that NSF may interact with neurotransmitter transporters and regulates these functions in the central nervous system (CNS). To verify the interaction of NSF with SERT, we conducted Western blot analysis. GST, GST-N-SERT and GST-C-SERT were incubated with mouse brain extracts. As shown in Figure 1C, NSF bound the N-terminal region of SERT specifically. In support of previous studies, N-terminal-specific binding of syntaxin-1A was confirmed [21-23] (Additional file 1: Figure S1).



**Figure 1 Identification of NSF as a novel binding partner of SERT.** (A) GST-N-SERT and GST-C-SERT were incubated with and without (as negative controls) the mouse brain extract. Bound proteins were detected by SDS-PAGE and silver staining. At least ten and three specific bands were observed in the GST-N-SERT and GST-C-SERT lanes, respectively, compared with negative controls. (B) Analysis using Mascot identified 24 peptides (in red) that matched NSF from band N-4 (in red on (A)). (C) N-tail-specific binding of NSF to SERT was confirmed by Western blot analysis. C-SERT, C-terminal domain of the serotonin transporter; GST, glutathione S-transferase; GST-C, GST-C-SERT; GST-N, GST-N-SERT; N-SERT, N-terminal domain of the serotonin transporter; NSF, *N*-ethylmaleimide-sensitive factor; MW, molecular weight.

**Table 1 Identification of GST-N-SERT and GST-C-SERT pulled-down proteins from mouse brain extracts**

Spot number	Gene name	Protein name	MW (Da)	Number	Sequence coverage	Score	Accession number	N-terminal specific	Cellular and molecular events
N-1	<i>Synj1</i>	Synaptojanin 1	172,509	23	14%	785	Q8CHC4	※	Endocytosis
N-2	<i>Cand1</i>	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	136,245	14	10%	526	Q6ZQ38	※	SCF complex assembly
N-3	<i>Aco2</i>	Aconitate hydratase, mitochondrial	85,410	14	19%	534	Q99KI0		
N-4	<i>Nsf</i>	Vesicle-fusing ATPase (NSF)	82,561	24	27%	1,010	P46460	※	
N-5	<i>Atp6v1a</i>	V-type proton ATPase catalytic subunit A	68,283	13	21%	466	P50516	※	Hydrolysis
N-6	<i>Crmp1</i>	Dihydropyrimidinase-related protein 1	62,129	12	20%	441	P97427	※	Axon guidance and cell migration
N-7	<i>Cct2</i>	T-complex protein 1 subunit beta	57,441	11	19%	202	P80314	※	Molecular chaperone
N-8	<i>Fscn1</i>	Fascin	54,474	14	25%	174	Q61553	※	Actin filament binding
N-9	<i>Eno1</i>	Alpha-enolase	47,111	16	24%	703	P17182		
N-10	<i>Cnp</i>	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	47,094	22	40%	341	P16330		
C-1	<i>Aco2</i>	Aconitate hydratase, mitochondrial	85,410	8	9%	287	Q99KI0		
C-2	<i>Eno1</i>	Alpha-enolase	47,111	8	20%	384	P17182		
C-3	<i>Cnp</i>	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	47,094	18	32%	225	P16330		

C-SERT, C-terminal domain of the serotonin transporter; GST, glutathione S-transferase; MW, molecular weight; N-SERT, N-terminal domain of the serotonin transporter.

**Co-localization of serotonin transporter and N-ethylmaleimide-sensitive factor in HEK293-hSERT cells**

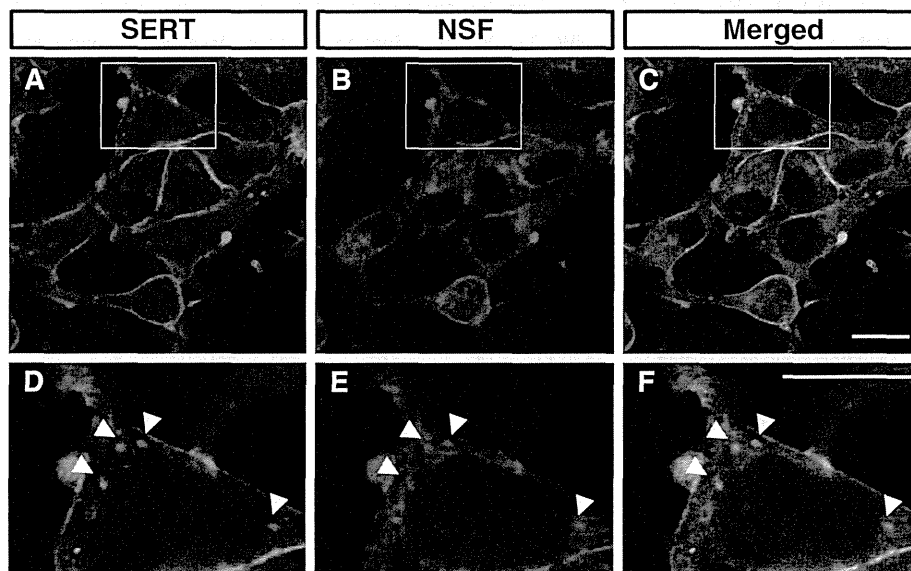
The subcellular localization of SERT and NSF was examined using immunofluorescence confocal microscopy. NSF is expressed endogenously in HEK293 cells. We established a stable human SERT-expressing cell line, HEK293-hSERT, using HEK293 cells as described in the Methods section. It was confirmed that SERT was transported to the plasma membrane in this cell line by double staining using antibodies to SERT and cadherin, a membrane marker (see Additional file 2: Figure S2). HEK293-hSERT cells were double labeled with antibodies to NSF and SERT, and it was revealed that NSF co-localized with SERT in the plasma membrane (Figure 2A,B,C) and intracellular particles (Figure 2D,E,F).

**Effect of N-ethylmaleimide-sensitive factor knockdown on serotonin transporter function and cellular localization**

We used RNA interference to knock down endogenous NSF expression. We confirmed that the efficacy of siRNA transfection into HEK293-hSERT cells was >90% (see Additional file 3: Figure S3). As shown in Figure 3A,B, it was confirmed that both of the siRNAs (siRNA-1 and -2) targeting NSF suppressed endogenous NSF protein levels by approximately 60% ( $P < 0.001$ , one-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test,  $n = 3$  each). Importantly, whole-cell SERT protein levels were not changed significantly by the siRNAs targeting NSF ( $F_{(2,14)} = 1.057$ ;  $P = 0.374$ , one-way

ANOVA,  $n = 5$  to 6 each) (Figure 3C,D). To investigate the effect of NSF on SERT uptake function, we conducted a fluorescence-based uptake assay in HEK293-hSERT cells. As shown in Figure 4, both NSF siRNAs decreased fluorescence uptake (siRNA-1;  $P = 0.005$  and siRNA-2;  $P < 0.001$ , one-way repeated measures ANOVA with Tukey's *post hoc* test,  $n = 8$  each). Fluoxetine completely inhibited uptake (Figure 4), including nonspecific uptake.

Next, we conducted biotinylation experiments in HEK293-hSERT cells using sulfo-NHS-SS-biotin. This compound, which binds to lysine and arginine residues in proteins, is cell impermeant and labels cell-surface proteins. Cells transfected with the siRNA of NSF (siRNA-2) or a negative control were incubated with sulfo-NHS-SS-biotin, followed by isolation of labeled proteins with avidin beads and analysis by Western blotting using anti-SERT antibodies. For the biotinylated membrane fraction, after Western blot analysis, the membrane was stained with CBB as a protein-loading control (Additional file 4: Figure S4). As shown in Figure 5A,B, the level of SERT protein at the cell membrane was decreased by an average of 50% ( $t = 5.399$ ;  $df = 16$ ;  $P < 0.001$ , two-tailed unpaired *t*-test,  $n = 9$ ) following NSF knockdown, despite no change in the total levels of SERT protein ( $t = -1.565$ ;  $df = 10$ ;  $P = 0.149$ , two-tailed unpaired *t*-test,  $n = 6$ ). Finally, we examined the distribution of SERT in HEK293-hSERT cells when NSF was suppressed. In support of the results of the experiment using sulfo-NHS-SS-biotin, the



**Figure 2 NSF co-localizes with SERT in HEK293-hSERT cells.** (A,B,C) Double immunocytochemical staining for SERT (green) and NSF (red) in HEK293-hSERT cells. NSF co-localizes with SERT in the cell membrane (merged). (D,E,F) High-magnification views of the regions boxed in panels (A), (B) and (C), respectively. Arrowheads indicate double-positive intracellular particles. Scale bar: 10  $\mu$ m. Results are representative of three independent experiments. NSF, N-ethylmaleimide-sensitive factor; SERT, serotonin transporter.

membrane expression of SERT was decreased by NSF knockdown in HEK293-hSERT cells (Figure 5C).

#### Association between serotonin transporter and N-ethylmaleimide-sensitive factor *in vivo*

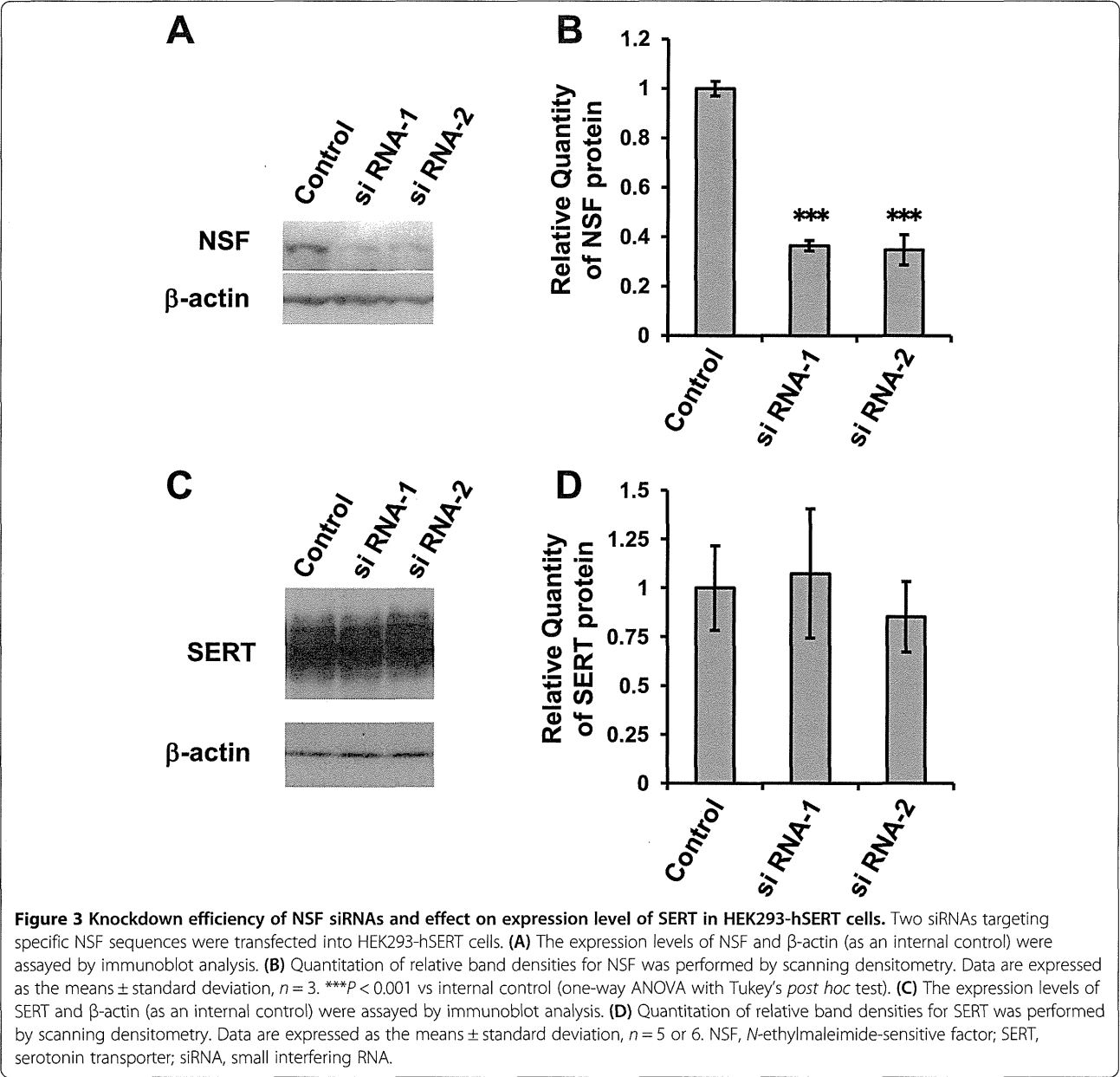
To determine the physiological significance of our findings *in vivo*, we examined: (a) the interaction between SERT and NSF in the mouse brain by immunoprecipitation and Western blotting and (b) the cellular distributions of NSF and SERT in cultured mouse raphe neurons by immunocytochemistry and microscopy.

Schmitt-Ulms and colleagues have established a method that covalently conserves protein interactions through tTPC [40]. This method enables the preservation of protein–protein interactions that occur under physiological conditions. We investigated the interaction of SERT with NSF in the mouse brain using this tTPC method. First, we examined the accuracy of the method. Total protein from non-tTPC- or tTPC-treated mouse brains was analyzed by immunoblotting, and we confirmed that SERT-containing cross-linked complexes were retained by this method (see Additional file 5: Figure S5A). Second, we checked whether the complexes were precipitated by anti-SERT antibodies and confirmed that SERT-containing cross-linked complexes were precipitated in a dose-dependent manner using this antibody (see Additional file 5: Figure S5B). Then, finally, we investigated the binding of SERT to NSF. As shown in Figure 6A, NSF co-immunoprecipitated with SERT from tTPC-treated brain cells indicating that NSF interacts with SERT in

the mouse brain under physiological conditions. Next, the cellular distributions of NSF and SERT in cultured mouse raphe neurons were examined. About 10% of all cultured cells were 5-HT-positive neurons in support of a previous report (data not shown) [36]. NSF was ubiquitously expressed in all cultured cells (data not shown). As shown in Figure 6B, triple immunocytochemical staining for SERT, NSF and 5-HT revealed that NSF co-localizes with SERT in the cell body and fibers of cultured serotonergic neurons.

#### SLC6A4 and N-ethylmaleimide-sensitive factor expression in the raphe region of post-mortem brains from autism patients

The demographic characteristics of subjects (seven with autism and eleven control subjects) are described in Tables 2 and 3. There were no significant differences in age ( $P = 1.000$ , Mann–Whitney  $U$  test), race ( $P = 0.305$ , Fisher's exact test), gender ( $P = 0.596$ , Fisher's exact test) and PMI ( $P = 0.513$ , Mann–Whitney  $U$  test) between the autism and control groups (Table 3). Although changes in SERT function and expression have been implicated in autism, mRNA expression of the *SLC6A4* gene that encodes SERT in the brains of autistic individuals has never been reported. Therefore, first, we measured *SLC6A4* expression in the raphe region of post-mortem brains from autistic individuals and controls using qRT-PCR. *SLC6A4* expression was normalized to the expression levels of an internal control (*ACTB*). As shown in Figure 7A, there are wide individual differences in the



expression level of *SLC6A4* among the subjects, and the level did not differ significantly between subjects with autism and controls ( $P = 0.928$ , Mann–Whitney  $U$  test). Then, we measured *NSF* expression in the same way. *NSF* expression was normalized to the expression of *ACTB*. We found that the *NSF* expression level in autism patients tended to be lower than that in controls; however, this trend was not statistically significant ( $P = 0.069$ , Mann–Whitney  $U$  test) (Figure 7B).

**SLC6A4 and N-ethylmaleimide-sensitive factor expression in lymphocytes from patients with autism spectrum disorders**  
*NSF* is expressed ubiquitously in all normal human tissues including lymphocytes [59]. Lymphocytes also

carry SERT [60]. Thus, we measured expressions of these genes in lymphocytes from individuals with ASD and age- and sex-matched controls by qRT-PCR. The demographic characteristics of the subjects (30 with ASD and 30 control subjects) are described in Table 4. There were no significant differences in age ( $P = 0.928$ , Mann–Whitney  $U$  test) or IQs (verbal IQ,  $P = 0.098$ , Mann–Whitney  $U$  test; performance IQ,  $P = 0.076$ , Mann–Whitney  $U$  test; full-scale IQ,  $P = 0.554$ , Mann–Whitney  $U$  test) between the ASD and control groups (Table 4). As shown in Figure 8A, the expression level of *SLC6A4* did not differ significantly between subjects with ASD and controls ( $P = 0.518$ , Mann–Whitney  $U$  test). On the other hand, we found that the *NSF* expression level in ASD