



亚核小体之“从哪里来?”

温增麒^{1*}, 龙海珍^{2*}

1. 中山大学·深圳医学院, 深圳 518107

2. 深圳湾实验室, 分子生理学研究所, 深圳 518132

* 联系人, E-mail: wenzq7@mail.sysu.edu.cn; longhaizhen@szbl.ac.cn

收稿日期: 2025-04-29; 接受日期: 2025-05-20; 网络版发表日期: 2025-06-06

国家重点研发计划(批准号: 2022YFA1302801)、国家自然科学基金(批准号: 32422015, 32370647)、深圳市优秀科技创新人才培养项目(批准号: RYX20221008092930079)、深圳市医学研究专项基金(批准号: B2402044)和深圳市科技计划(任务书编号: GXWD20201231165807008, 项目文本号: 20220817134430001)资助

摘要 真核生物的基因组以染色质形式紧密包装于细胞核内, 核小体则构成了染色质的基本结构单元. 在细胞中, 核小体并非静态存在, 其结构具有高度动态性, 并与染色质的结构调控与功能执行密切相关. 近年来, 随着研究技术的不断进步, 越来越多的证据表明, 在核小体结构的动态变化与调控过程中, 能够形成多种多样的亚核小体结构, 进而参与染色质的构象调控与生物学功能调节. 作为一种新兴的表观遗传特征, 亚核小体正受到日益广泛的关注. 本文将综述近年来利用单分子技术、原子力显微镜、冷冻电子显微镜及高通量测序等方法在亚核小体结构研究方面的最新进展, 重点探讨亚核小体结构的动态特性, 以及其在染色质重塑、转录和DNA复制等过程中形成的分子机制.

关键词 亚核小体, 表观遗传, 染色质重塑, 转录, DNA复制

染色质作为真核生物基因组的基本组织形式, 是由DNA与组蛋白通过复杂的相互作用构建而成的一种高度动态的结构. 其核心功能不仅在于将约2 m长的线性DNA压缩至微米级的细胞核空间内, 更在于通过调控DNA的可及性, 参与基因表达、DNA复制与损伤修复等关键生命过程. 核小体(nucleosome)是染色质的基本重复单元, 由约147 bp的DNA缠绕在由两分子H2A, H2B, H3和H4组蛋白组成的八聚体上形成^[1]. 基因组中的核小体有序排列, 形成“串珠状”结构, 为染色质的高级结构和功能奠定了基础^[2,3]. 长期以来, 核小体被认为是一种相对稳定的静态复合体. 然而, 随着对染色质动态性理解的不断加深, 研究者逐渐认识到核

小体并非一成不变. 基因组功能的实现依赖大量反式作用因子与顺式调控元件之间的精细协作, 例如, 基因转录需要转录因子和RNA聚合酶与启动子、增强子等顺式元件的结合, DNA复制起始则依赖复制因子与复制起点的相互作用. 在这些过程中, 核小体表现出显著的动态行为, 包括局部DNA-组蛋白相互作用的松解、整体位移、部分或完全解聚及重装配, 伴随着多种非经典核小体亚结构——亚核小体(subnucleosome)的出现.

近年来, 亚核小体的研究受到了广泛关注. 随着对亚核小体调控机制及其生物学功能认识的不断深入, 亚核小体本身也逐渐被视为一种新的表观遗传特

引用格式: 温增麒, 龙海珍. 亚核小体之“从哪里来?” 中国科学: 生命科学, 2025, 55: 1060–1072

Wen Z Q, Long H Z. Subnucleosome—where does it come from? (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2025, 55: 1060–1072, doi: 10.1360/SSV-2025-0130

征^[4-8]. 本文将回顾近年来基于单分子成像、原子力显微镜、冷冻电子显微镜(电镜)以及高通量测序等技术在亚核小体结构研究中的重要进展, 讨论亚核小体的概念与研究范畴, 并重点探讨亚核小体的动态特性及其表观遗传调控, 以及亚核小体在染色质重塑、转录和DNA复制等生物学过程中的形成机制.

1 亚核小体的发现与定义

虽然核小体晶体结构显示, DNA在缠绕于组蛋白八聚体表面后, 其结合其他DNA结合蛋白的能力受到了显著限制^[1], 但体外实验却发现, 许多DNA结合蛋白仍可识别并结合核小体保护的DNA区域^[9]. 为了解释这一现象, Polach和Widom^[10,11]提出, 核小体上的DNA处于自发展开与重新缠绕的动态平衡状态, 这一现象后来被称为“核小体呼吸”(nucleosome breathing), 并通过限制性内切酶切割位于核小体内部的限制性位点验证了这一动态性. 在进一步的研究中, Anderson和Widom^[12]利用同样的方法发现, 核小体上DNA的动态性由外向内逐渐减弱. 荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)技术可通过测量供体和受体荧光分子之间能量转移效率, 间接推算两者之间的距离变化, 广泛应用于核酸和蛋白质等生物大分子的相互作用研究^[13]. 为直接监测核小体DNA的展开与缠绕动态, Li和Widom^[14,15]在DNA末端和组蛋白特定位点分别标记荧光分子, 利用FRET观察到, 核小体末端DNA与组蛋白之间的距离呈现出快速的动态波动. 在生理盐浓度下, DNA保持完全缠绕的时间仅约250 ms, 随后发生自发展开, 展开的DNA则可在10~50 ms内重新缠绕. 单分子FRET(single-molecule FRET, smFRET)技术的应用进一步确认了核小体DNA的自发动态性^[16,17].

原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)因具备无需标记、可在近生理条件下进行单分子亚纳米分辨率结构解析的优势, 成为研究亚核小体结构及核小体动态行为的重要工具, 同时也可以为冷冻电镜静态结构提供重要动态数据补充. Shlyakhtenko等人^[18]使用Widom 601序列体外重构了核小体, 并利用单分子AFM成像技术在干燥或者低盐溶液环境中对核小体的动态性进行了观测, 均发现核小体DNA可以自末端自发展开, 并逐步释放多达几十个碱基对. 利用相同

的实验体系, 在把AFM成像时间分辨率提高至亚秒级后, Miyagi等人^[19]观察到核小体呈现多种自发动态变化, 包括不同程度的DNA展开, 乃至组蛋白与DNA的完全解离. Bintu等人^[20]通过甲醛固定在核小体上转录的酵母RNA聚合酶II, 然后利用AFM观察发现转录延伸后核小体可部分丧失组蛋白, 并重塑为六聚小体. Katan等人^[21]进一步利用高速AFM发现, 四聚小体(tetrasome)可以在DNA上滑动并发生可逆跳跃, 还能在解离过程中形成稳定的DNA环. 随着AFM硬件和自动化图像分析技术的发展, 单次实验中对数千个分子的快速成像成为可能, 大幅提升了数据的准确性与统计能力^[22,23]. Konrad等人^[24]利用自动化宽视野AFM成像技术在干燥环境下对体外重构的Widom 601核小体进行成像, 通过系统分析约一万个核小体的AFM成像数据发现, 常规核小体存在以5 bp为步长的多种DNA展开状态, 而且一侧DNA的展开会对另一侧形成阻碍作用, 这种特性与DNA序列本身的相关性较弱.

相比于FRET和AFM等方法, 直接解析大分子三维结构能够更清晰地揭示核小体DNA与组蛋白的构象变化, 明确界定亚核小体结构的类型. 早期, Kato等人^[25]通过X射线解析了体外重构的重叠二核小体结构, 首次捕捉到除完整组蛋白八聚体形成的核小体外, 还存在缺失一个H2A-H2B二聚体的六聚小体结构. 近年来, 随着冷冻电镜(cryo-electron microscopy, cryo-EM)技术在硬件和数据处理方法上的显著进步, 研究者得以解析出更多种不同构象的亚核小体. Bilokapic等人^[26,27]通过对核小体冷冻电镜图像的分类分析, 发现了包括DNA局部展开、H2A-H2B二聚体缺失以及八聚体构象变化诱导DNA转位等多种亚核小体状态. 值得注意的是, 大多数已有核小体结构研究依赖Widom 601或 α -卫星DNA序列, 这在一定程度上限制了结构多样性的观察. 相比之下, Armeev等人^[28]利用结合组蛋白亲和力较弱的Widom 603序列重构核小体, 并用冷冻电镜观察发现, 其核小体DNA自发呈现多种不同程度的展开状态, 进一步印证了核小体自身的动态性, 且该动态性受到DNA序列的调控. 此外, 在核小体与分子伴侣、染色质重塑复合物及转录机器的相互作用过程中, 也观察到了丰富的亚核小体结构特征. Kujirai等人^[29]解析了毕赤酵母(*Komagataella pastoris*)RNA聚合酶II在核小体上转录时的结构, 揭示了DNA展开约20, 50和60 bp以及丢失一份H2A-H2B二聚体的多种中

间状态. Ehara等人^[30]在研究FACT(facilitates chromatin transcription)复合物辅助转录延伸的过程中发现, 转录延伸复合物前方的核小体DNA可展开约100 bp, 而在复合物通过后, 可形成缠绕约40 bp DNA的六聚小体, 以及缠绕约75 bp DNA的残留八聚小体等多种亚核小体状态. 在染色质重塑方面, Zhang等人^[31]解析了嗜热毛壳菌(*Chaetomium thermophilum*)中重塑复合物INO80与六聚小体的复合结构, 发现丢失一份H2A-H2B二聚体的六聚小体是激活INO80的重要天然底物. 另一方面, Girvan等人^[32]通过冷冻电镜观察到在SWR1移除一个H2A-H2B二聚体后, 六聚小体与SWR1结合, 并可进一步装配H2A.Z-H2B异二聚体. 除了体外重构实验, 对染色质进行原位成像也揭示了细胞内核小体的非经典结构状态. 例如, Tan等人^[33]采用冷冻断层扫描电子显微镜(cryo-ET)技术对酵母细胞核中的核小体进行原位分析, 发现大部分核小体并非经典核小体构象, 且呈现出高度异质, 但其具体结构特征仍有待研究.

除了在体外实验中观察到亚核小体的存在, 越来越多针对细胞内染色质的研究也支持亚核小体结构在活细胞中普遍存在. 微球菌核酸酶(micrococcal nuclease, MNase)具有核酸内切酶和外切酶活性, 能够优先切割核小体间的连接DNA(linker DNA), 同时保留由核小体保护的DNA片段. 早在20世纪70年代, 微球菌核酸酶便被用于染色质结构研究, 通过分析被保护DNA的片段长度, 揭示了核小体的基本结构特征^[34]. 随着高通量测序技术的发展, Widom和Nislow实验室^[35-37]建立了MNase-seq方法, 将微球菌核酸酶消化后获得的DNA片段进行大规模平行测序, 实现了在酿酒酵母(*S. cerevisiae*)全基因组范围上定位核小体的位置. 随后, Henikoff和Paszkiwicz实验室^[38,39]进一步发展了该方法, 采用双端测序以精确测量被保护DNA片段的实际长度, 从而可以用于解析亚核小体结构. 他们的研究发现, 除经典核小体对应的147 bp DNA片段外, 还存在大量短于147 bp的片段, 其中80~130 bp片段可能对应于六聚小体或四聚小体结构, 而小于80 bp的片段则可能由转录因子等染色质结合蛋白保护而成. 结合组蛋白染色质免疫沉淀(ChIP)的方法进一步证实了这一现象. Weber等人^[40]和Wen等人^[41]分别在果蝇和小鼠胚胎干细胞中, 通过MNase-seq和双端测序分析, 观察到大量短于147 bp的DNA片段, 在90, 105和127 bp等位

置形成特征性峰值, 提示细胞内普遍存在亚核小体结构^[40,41]. 此外, Ramachandran等人通过针对H2A.Z进行双轮标签富集的实验发现, 经过第二轮富集后短片段DNA的比例明显减少, 表明这些短片段来源于缺失一个H2A.Z-H2B二聚体的六聚小体^[42]. 为了提高对小片段DNA的检测效率, Ramani等人开发了MNase-SSP(single-stranded preparation)测序技术, 进一步验证了基因组中存在大量亚核小体相关片段^[43]. 除了基于MNase的组测方法, ChIP-exo技术也可用于细胞内亚核小体结构的精确分析. 通过在单碱基分辨率上绘制组蛋白与DNA的结合位点图谱, Rhee等人系统地分析了酵母中H2A, H2B, H3和H4四种组蛋白的结合模式, 发现转录起始位点下游的+1核小体位置存在大量亚核小体, 包括缺失H2B和H4的亚核小体状态^[44]. 但是, 由于染色质上有大量非组蛋白的结合, 基于测序的技术仍难以排除非组蛋白, 如转录因子保护的DNA片段对实验结果的影响.

综上所述, 在核小体动态变化及调控过程中, 会出现多种不同于经典核小体的结构状态, 统称为亚核小体(subnucleosome). 常见的亚核小体形式包括因DNA局部展开导致包裹长度短于147 bp的展开核小体(unwrapped nucleosome), 组蛋白八聚体不完整的六聚小体(hexasome)和四聚小体(tetrasome). 此外, 还包括部分组装核小体(partially assembled nucleosome)^[45]、脆弱核小体(fragile nucleosome)^[46]以及预核小体(prenucleosome)^[47]等.

2 亚核小体结构的调控

2.1 核小体结构自身的动态性

核小体结构的动态特性最早由Li和Widom通过荧光共振能量转移(FRET)方法系统研究. 在该研究中, 供体荧光分子Cy3被标记于Widom 601 DNA的5'末端, 受体荧光分子Cy5则分别标记在接近核小体进出口区域的H2A K119C或H3 V35C位点. 实验结果显示, 随着NaCl浓度升高(在0.5 mol/L以下, 核小体整体结构仍保持完整), FRET效率逐渐降低, 提示核小体末端的DNA可能发生了局部解开^[14]. 为进一步探究核小体DNA的动态行为, 研究人员在核小体DNA 8~27 bp处引入了LexA结合位点, 并分析了LexA蛋白与核小体DNA结合的动力学特征. 结果表明, 核小体中DNA的缠绕状

态平均可维持约250 ms, 随后自发展开, 展开状态持续约10~50 ms^[15]. 值得注意的是, 随着LexA结合位点位置逐渐向核小体内部移动, DNA自发展开的频率明显降低^[17,48]. 这些结果共同表明, 即使在核小体整体结构稳定的条件下, 末端DNA仍具有高度动态性, 能够进行自发的局部展开与重新缠绕. 此后, 单分子FRET技术进一步证实了这一现象^[16,17]. 此外, Poirier等人^[49]通过分析核小体串珠结构中限制性内切酶切位点的可及性发现, 染色质高阶折叠显著降低了连接DNA的可及性, 但对核小体包裹的DNA影响较小. 进一步的磁镊单分子实验表明, 在施加外力的条件下, 核小体串珠的展开动力学与单个核小体高度一致^[50], 进一步支持了在染色质纤维中, 单个核小体仍能保持DNA局部展开的动态特性.

盐离子浓度能够有效调节组蛋白与DNA之间的离子键相互作用. 虽然细胞内环境下盐浓度通常维持相对稳态, 但在体外条件下研究核小体对盐浓度变化的响应过程, 亦为揭示其动态特性提供了重要线索. 经典组装体系表明, 在高盐条件下混合DNA与组蛋白, 并随后将盐浓度从2 mol/L逐步降低至生理水平, 可高效稳定地组装核小体^[51]. 在这一过程中, (H3-H4)₂四聚体首先与DNA结合, 随后H2A-H2B二聚体结合形成完整核小体^[51,52]. 相反, 逐步升高盐浓度则首先破坏(H3-H4)₂与H2A-H2B之间的界面, 继而引发H2A-H2B的解离, 最终导致核小体整体解组装^[53~56]. 虽然上述研究揭示了核小体解组装过程中组蛋白复合体的变化规律, 但对核小体DNA动态特性的理解仍较为有限. 在施加外力条件下, 核小体解组装过程中的DNA与组蛋白相互作用得到了进一步解析. Mihardja等人^[57~60]利用单分子光镊技术在核小体DNA两端施加外力, 发现核小体DNA的解开呈现出两个阶段: 在约3 pN的外力下, 核小体外圈DNA打开, 且撤除外力后核小体结构能够自发恢复; 而在8~9 pN的外力作用下, 内圈DNA进一步展开, 此时即使移除外力, 核小体结构亦难以复原. Hall等人^[61]通过光镊诱导DNA解链, 进一步揭示了DNA与组蛋白之间的结合特性, 发现最强的相互作用位于核小体中心轴(dyad)区域, 此外在中心轴±40 bp处亦存在次强结合位点. 当DNA解链至中心轴位置后撤除外力, 核小体结构可以恢复; 而若解链超过中心轴, 则导致核小体构象不可逆性破坏. 这些研究系统描述了核小体内部DNA-组蛋白相互作用的空间分布特征.

DNA序列对核小体的定位、结构与稳定性具有重要影响^[62~64]. 晶体学研究显示, 在Widom 601序列上组蛋白-DNA的结合并不均匀分布^[1,65]. 有趣的是, 由于Widom 601 DNA两端柔韧性存在差异, 导致核小体上两端DNA的展开动态性呈现出明显的不对称性, 其中柔韧性较高一端的稳定性更高^[60]. 这一特性与序列中AT碱基对含量相关, 因AT碱基对有助于DNA螺旋的扭曲与柔化, 从而提升该区域DNA的动态稳定性^[60,62]. 此外, 外界环境因素亦可调节核小体动态性. 高盐环境通过削弱组蛋白-DNA之间的离子键作用, 降低了外圈与内圈DNA展开所需的外力^[59]. 类似地, 组蛋白修饰也能显著影响核小体稳定性. 例如, DNA进出口区域赖氨酸残基(如H3K56, H4K77和H4K79)的乙酰化可促进外圈DNA的展开^[63,66]. 这些研究共同表明, 核小体不仅具有一定的稳定性, 还具备高度动态性和可塑性, 为转录、复制等生物学过程中染色质结构的灵活调控提供了基础.

2.2 组蛋白变体与组蛋白修饰对亚核小体结构的调控作用

组蛋白变体H2A.Z与常规H2A仅有约60%的序列同源性. 尽管整体核小体结构类似, H2A.Z核小体在表面特征上具有延伸的酸性区域及独特的C端尾部^[67]. Li等人^[68]通过分子动力学模拟表明, H2A.Z能够促进核小体DNA的自发展开, 使DNA在两端各释放约40个碱基对. H2A.Z的N端与C端尾部在这一过程中发挥了关键作用, 而H3.3变体对DNA展开的调控效应则较为有限. 有趣的是, 通过原子力显微镜观察体外重构的H2A.Z核小体发现, H2A.Z核小体具备沿DNA滑动的能力^[69]. 在细胞内, H2A.Z核小体通常富集于转录起始位点下游的+1位核小体位置. Hainer和Fazzio^[70]报道H2A.Z核小体富集亚核小体片段, 而Wen等人^[41]则通过MNase-seq分析进一步证实, H2A.Z核小体在体内具有比常规H2A核小体更高的展开程度. 这些特性可能有助于RNA聚合酶II (RNAPII)在转录过程中克服核小体所造成的物理障碍^[71,72]. MacroH2A是另一种H2A家族的组蛋白变体, 主要富集于异染色质区域^[73]. MacroH2A通过与核小体DNA进出口区域结合, 稳定了DNA在核小体上的缠绕状态, 并在酶切实验中表现出更广泛的DNA保护作用^[74].

动粒作为调控染色质在有丝分裂和减数分裂中精

确分配的关键结构,其组装位置由着丝粒序列决定^[75]。在着丝粒区域,常规组蛋白H3被特异性组蛋白变体CenH3(哺乳动物中为CENP-A,酵母中为Cse4)所取代^[75]。通过体外重构核小体进行超螺旋分析发现,与常规核小体左手螺旋缠绕DNA不同,Cse4核小体上DNA呈现右手螺旋缠绕^[76,77]。对酵母染色质进行MNase-seq实验表明,Cse4核小体保护的DNA片段长度约为80 bp,提示其处于高度展开的构象^[78]。Migl等人^[79]基于冷冻电镜解析了体外重构的Cse4核小体的三维结构,进一步确认其保护的DNA少于常规核小体。此外,Konrad等人^[24]通过原子力显微镜观察发现,与常规H3核小体不同,CENP-A核小体两端DNA的展开过程相互独立,不存在抑制效应。Kawasaki等人^[80]最近解析了(CENP-A-H4)₄八聚小体的冷冻电镜结构,该八聚小体不包含H2A和H2B组蛋白,以左手螺旋形式缠绕约120 bp的DNA。这些结果表明,着丝粒特异性组蛋白变体能够重塑核小体构象,从而适应着丝粒染色质的特殊功能需求。

组蛋白上的可逆化学修饰(包括甲基化、乙酰化、磷酸化与泛素化等)广泛影响核小体的构象与动态性^[81],并在发育调控等生理过程中发挥重要作用^[82,83]。通过对体外重构核小体上的限制性酶切位点进行酶切实验表明,乙酰化修饰可以削弱DNA与组蛋白之间的相互作用,促进DNA的局部展开并提高染色质开放性^[84]。单分子实验证据进一步支持,乙酰化修饰能够部分解除核小体对RNAPII的阻碍,提高转录延伸的效率^[85]。Konrad等人^[86]通过原子力显微镜发现,H3K36me3修饰可促进核小体DNA的展开,同时消除两端DNA展开之间的互相抑制现象,这一特点与CENP-A核小体相似。相比之下,H3S10磷酸化对核小体动态性影响较小^[86],而H3T118磷酸化则能够显著削弱DNA与组蛋白的结合,增加核小体的动态性和DNA的开放性^[87]。核小体通过连接DNA彼此连接,而连接DNA区域可以结合组蛋白H1^[88]。H1的结合使核小体在MNase酶切实验中保护的DNA长度增加至约167 bp^[89]。尽管结合H1后的核小体仍可进行DNA的自展开与缠绕,但展开频率明显下降,且转录因子的结合效率亦受抑制^[90]。然而,H3K56ac修饰可在一定程度上拮抗H1的抑制作用^[90]。这些研究共同提示了组蛋白变体与组蛋白修饰对亚核小体结构的复杂调节机制。

2.3 染色质重塑过程中的亚核小体结构

染色质重塑因子通过水解ATP,利用释放的能量调节核小体中组蛋白与DNA的相互作用,从而促进组蛋白与DNA之间的相对位移,改变核小体的构象或定位,并调控DNA对结合蛋白的可及性。在这一过程中,染色质重塑因子可以催化组蛋白八聚体沿DNA滑动、驱动八聚体的部分或完全解离,或介导组蛋白变体的交换,进而重塑核小体结构^[91]。NuRD复合体在异染色质区域的基因沉默过程中发挥关键作用。该复合体通过CHD家族ATP酶亚基催化染色质重塑,调节DNA的可及性,进而控制基因转录^[92]。在CHD家族的九个成员(CHD1~CHD9)中,CHD3能够结合组蛋白H3,且其活性受H3K9me3修饰的增强,从而促进核小体DNA的局部展开^[93]。在多个已解析的染色质重塑因子与核小体的复合物结构中,普遍观察到核小体DNA呈部分展开状态。例如,在Farnung等人^[94]报道的酵母Chd1与核小体复合物的冷冻电镜结构中,Chd1的SANT和SLIDE结构域结合在核小体DNA末端,促使约20 bp的DNA从核小体表面展开。在Willhoft等人^[95]解析的酵母SWR1复合物与核小体的结构中,Arp6和Swc6亚基通过与H2A组蛋白C端尾部及酸性区域的相互作用,使核小体末端约10 bp的DNA展开。在INO80复合物与核小体的冷冻电镜结构中,ATP酶活性结构域直接与DNA结合并促使其从核小体表面展开,参与后续的DNA转位过程^[96,97]。但是也有例外,Sia等人^[98]最近解析了ISWI重塑核小体过程中的多个状态的结构,可以观察到ISWI通过使DNA形成凸起导致与组蛋白发生相对位移,但是没有观察到明显的DNA展开过程。这些研究结果表明,染色质重塑的机制是多样的,亚核小体结构在染色质重塑过程中的稳定性和作用仍有待研究。

2.4 DNA复制后核小体装配过程中的亚核小体结构

在DNA复制过程中,细胞不仅回收旧有的组蛋白,还需要大量合成新的组蛋白,以在新合成的DNA链上重新装配核小体^[99-101]。新生的H3-H4组蛋白首先与HSP90,HSC70和NASP等分子伴侣结合,防止异常聚集;随后,NASP-H3-H4复合物与RBAP46-HAT1结合,催化H4在K5和K12位点发生乙酰化修饰;随后,在组蛋白伴侣ASF1的介导下,H3.1-H4与CAF1复合物结

合, 而H3.3-H4则与HIRA复合物结合, 最终被装配到染色质中^[102]。最近, Liu等人^[103]解析了CAF1复合物介导H3-H4装配的多个冷冻电镜结构。在其中一种状态中, (H3-H4)₂四聚体以左手螺旋方式缠绕约120 bp DNA; 而在另一种状态中, (H3-H4)₂四聚体结合两分子的CAF1复合物, 并以右手螺旋缠绕约108 bp DNA。鉴于经典核小体结构中DNA以左手螺旋缠绕于组蛋白八聚体上^[1], 这些结果提示上述结构可能代表核小体装配过程中的中间状态。Nozawa等人^[104]也解析了(H3-H4)₂四聚体结构, 并通过细胞内交联实验检测到与之相符的组蛋白相互作用模式, 支持细胞内存在类似亚核小体结构的可能性。新合成的H2A-H2B组蛋白通常与NAP1或FACT伴侣结合, 并最终被装配到染色质中^[102]。在酵母中, NAP1以二聚体形式结合H2A-H2B异二聚体, 且其缺失会导致MNase酶切后产生更多小片段DNA, 表明染色质结构受到扰动^[105]。在体外转录实验中, NAP1能协助H2A-H2B从展开的核小体中解离, 促成六聚小体的形成^[106]。FACT复合物能够同时结合H3-H4和H2A-H2B, 在转录与DNA复制过程中协助核小体的解聚与重装^[107]。FACT中的SPT16亚基能结合H2A-H2B并促进核小体末端DNA的展开^[108]。单分子实验进一步表明, 在施加外力时, SPT16促进H2A-H2B从核小体中解离, 而SSRP1亚基则稳定H3-H4四聚体于DNA上, 并促进H2A-H2B重新装配, 从而维持核小体结构的完整性^[109]。Wang等人^[110]也证实, FACT可以促进H2A-H2B组蛋白在(H3-H4)₂四聚体上的装配, 形成六聚小体或完整核小体。在FACT介导的核小体装配过程中, DNA呈展开状态的亚核小体为FACT的结合提供了平台^[111]。这些研究表明, 组蛋白伴侣可能参与调控体内亚核小体结构状态。在果蝇中, DNA复制后核小体能够快速恢复至复制前的占位状态, 并且随着染色质成熟, 核小体定位信号逐渐增强至复制前水平^[112]。在这一过程中, 核小体的缠绕状态也发生动态变化: 复制后的新生核小体保护的DNA片段较短, 随着染色质逐步成熟, DNA保护长度增加, 反映出核小体由松散向紧密缠绕的转变^[113]。值得注意的是, 在转录抑制剂处理后, 新生核小体的缠绕成熟速度减缓, 提示转录活性有助于核小体结构的稳定化^[113]。此外, 无核小体区域(NFR), 包括转录起始位点和DNA复制起点, 在DNA复制后也一度被核小体占据, 但随后核小体信号减弱, 小片段DNA信号增强, 提

示复制因子或转录因子可能与核小体竞争结合, 从而导致核小体局部丢失^[112]。

2.5 转录过程中的亚核小体结构

在真核生物中, 转录由RNA聚合酶以染色质为模板进行, 核小体结构在此过程中发生动态重塑。Chen等人^[114]最近通过冷冻电镜解析了多个与核小体结合的转录起始复合物-中介子(mediator)的结构状态, 发现核小体通过结合TFIIH亚基p52以及中介子亚基MED19和MED26, 促进转录起始复合物-中介子在启动子上的组装, 提示亚核小体结构在转录起始过程中可能发挥调控作用。Bintu等人^[85]利用单分子光镊技术发现, 核小体能显著降低RNA聚合酶 II (RNAPII) 的转录速度和效率; 而去除组蛋白尾部或引入Sin突变(削弱组蛋白与DNA中心轴的相互作用)可以通过促进核小体DNA的展开, 降低核小体对转录的阻碍作用。Ramachandran等人^[42]通过MNase-seq在果蝇中系统研究了转录对核小体重塑的影响。他们发现, 在转录起始位点(TSS)下游的+1核小体位置, 存在富集的亚核小体, 包括DNA进口端或出口端展开的状态; 干扰拓扑异构酶活性或敲除组蛋白伴侣会增加这些亚核小体的比例, 而抑制RNAPII释放或延伸则使亚核小体数量减少。进一步的研究表明, 转录活动还能促进DNA复制后新生核小体对DNA的保护程度提升, 提示转录有助于加强核小体内部DNA与组蛋白的相互作用, 稳定染色质结构^[113]。近年来, 多项研究解析了RNA聚合酶在核小体上转录的复合物结构。Kujirai等人^[29]报道了毕赤酵母RNA聚合酶在核小体上延伸的冷冻电镜结构, 观察到RNA聚合酶在前进过程中逐步展开核小体上的DNA至约20, 50和60 bp, 同时在靠近聚合酶一侧出现H2A-H2B二聚体丢失的现象。当DSIF, SPT6, PAF1c和TFIIS等延伸因子参与转录时, RNA聚合酶接近核小体中心轴, 核小体上游的展开DNA会折返结合到远端组蛋白上^[115]。在FACT复合物参与的转录延伸过程中, 靠近转录复合物一侧的核小体DNA可被展开至约100 bp, 随后组蛋白与DNA解离, 并在FACT的调控下, 组蛋白六聚体首先装配到上游DNA上, 紧接着近端H2A-H2B二聚体重新装配, DNA重新缠绕形成完整的核小体^[30]。在此过程中, 还可观察到缠绕约40 bp DNA的六聚小体和缠绕约75 bp DNA的八聚小体等亚核小体状态^[30]。此外, 转录活动会引发DNA超螺旋的变化,

进而调控亚核小体的构象。Ma和Wang^[116]的研究表明, DNA超螺旋可以通过调节核小体构象影响转录过程。Sheinin等人^[117,118]进一步在不同扭矩水平下观察核小体动态性, 发现超螺旋不仅可以打开核小体的外圈和内圈DNA, 还能促使H2A-H2B二聚体的丢失。Shi等人^[119]最近通过单分子FRET和核磁共振谱技术研究了(H3-H4)₂四聚小体的结构特征, 发现与核小体相比, (H3-H4)₂四聚小体中DNA和组蛋白之间的相互作用减弱, 而动态性显著提高, 从而降低对RNA聚合酶II的转录障碍。这些研究共同提示了转录过程对亚核小体结构的调控作用, 以及亚核小体结构在转录过程中可能发挥调控作用。

3 总结与展望

本文回顾了近年来基于单分子成像、冷冻电镜以及高通量测序等技术发现的亚核小体结构状态, 在此基础上提出了亚核小体的概念与研究范畴; 并重点探讨了亚核小体的动态特性及其表观遗传调控, 以及亚核小体在染色质重塑、转录和DNA复制等生物学过程中形成机制(图1)。亚核小体的发现重新定义了染色质动态性的内涵。从结构层面来看, 亚核小体不仅代表核小体动态装配和重塑过程中的中间状态, 也是一类新的染色质结构特征。Wen等人^[113]最近的研究表明, 核小体在全基因组范围内的缠绕状态并不均一, 而是在兆碱基对(Mb)尺度上形成特定的结构域, 称为核小体缠绕结构域(nucleosome wrapping domain)。其中, 紧密型缠绕结构域富集缠绕程度更高的核小体, 而松弛型缠绕结构域则富集缠绕程度较低的核小体。在功能层面, 尽管已有大量研究表明, 亚核小体状态广泛存在于DNA复制偶联的染色质装配过程中, 并与转录活动相关, 但目前只有少数工作直接揭示了亚核小体的具体生物学功能。例如, Hodges等人^[16]通过体外单分子实验发现, 核小体的自发展开有助于促进RNAPII的转录延伸。此外, 六聚小体可以作为染色质重塑复合物INO80的底物, 激活其重塑活性^[31,120]。有趣的是, Wen等人^[113]进一步发现, 紧密型核小体缠绕结构域与常染色质区域、Hi-C技术定义的A染色质区室, 以及RT-seq定义的早期复制结构域高度对应; 而松弛型缠绕结构域则对应异染色质区域、Hi-C中的B区室和晚期复制结构域。这些高度一致的相关性为亚核小体结

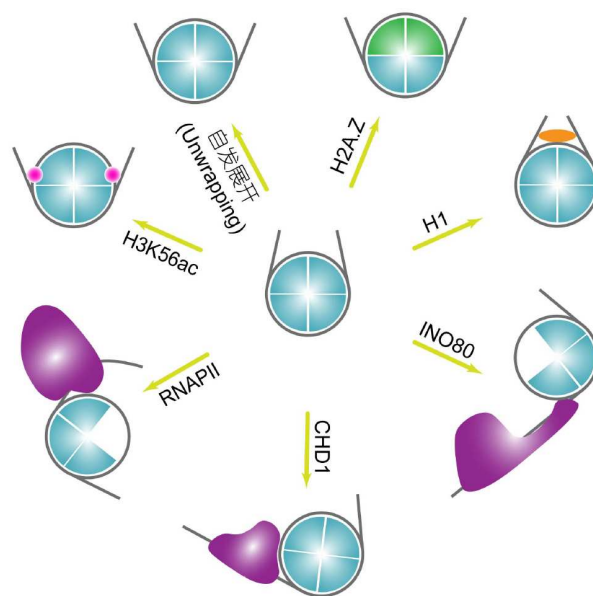


图1 亚核小体结构的形成机制: 核小体可以自发展开形成亚核小体; H3K56ac修饰和组蛋白变体H2A.Z可以促进核小体上DNA的展开; 组蛋白H1帮助稳定核小体上的DNA; 染色质重塑因子CHD1和INO80, 以及RNA聚合酶RNAPII可以打开核小体上的DNA促进形成亚核小体; INO80重塑核小体和RNAPII在核小体上延伸时还可以导致H2A-H2B组蛋白的缺失, 形成六聚小体

Figure 1 Mechanism of subnucleosomal structure formation: a nucleosome can spontaneously unfold to form a subnucleosome. The histone modification H3K56ac and the histone variant H2A.Z can promote the unwrapping of DNA on the nucleosome. Histone H1 helps stabilize DNA on the nucleosome. Chromatin remodeling factors CHD1 and INO80, as well as RNA polymerase II (RNAPII), can open the DNA on the nucleosome to facilitate subnucleosome formation. INO80 remodeling of the nucleosome and RNAPII elongation on the nucleosome can also lead to the loss of H2A-H2B histone dimers, resulting in the formation of a hexasome

构的生物学功能研究提供了新的视角。

亚核小体的研究仍处于起步阶段, 现阶段有待解决的核心科学问题主要包括两个方面: 一是明确具有稳定构象特征的亚核小体结构类型; 二是阐明亚核小体结构的调控机制和生物学功能。由于亚核小体本身具有高度的复杂性和动态特性, 目前针对亚核小体的体外与体内研究仍面临诸多挑战。在体外研究中, 往往难以同时兼顾亚核小体的结构状态和动态变化过程, 即难以同时获得高空间分辨率和高时间分辨率的数据。例如, 单分子磁镊、光镊以及原子力显微镜等技术可以以极高的时间分辨率捕捉亚核小体的动态行为, 但通常缺乏对其生化组分和空间结构的详细信息; 而晶体学和冷冻电镜等结构生物学方法则能够提供高

精度的生化和空间结构信息,却无法直接反映亚核小体的动力学变化。在体内研究方面,目前多依赖于基因组学技术,如MNase-seq和ChIP-exo,这些方法虽然可以揭示亚核小体的基因组定位特征,但通常无法明确具体的亚核小体类型,例如,难以区分DNA局部展开与组蛋白丢失所形成的不同亚核小体状态。此外,亚核小体作为染色质的一种结构状态,常与染色质重塑、转录和DNA复制等重要生物学过程偶联,使得解析其特异性调控机制与生物学功能变得尤为复杂。随

着电镜技术的进步,研究人员开始能够在细胞内直接观察核小体及染色质的超微结构^[33,121~124]。尽管目前该领域仍面临诸多技术难题,如样品制备、成像分辨率与解析能力等限制,但电镜技术在体内亚核小体结构与功能研究中的应用展现出巨大的潜力。随着技术成熟,通过结合成像和组学技术实现“多模态融合”,体内亚核小体的全景时空图谱及其在染色质生物学功能中的调控作用将水落石出,从而为表观遗传学和靶向染色质药物开发开辟新的方向。

参考文献

- 1 Luger K, Mäder A W, Richmond R K, et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 1997, 389: 251–260
- 2 Chen P, Li W, Li G. Structures and functions of chromatin fibers. *Annu Rev Biophys*, 2021, 50: 95–116
- 3 Cao H, Wu D, Wei Y, et al. Variations in chromatin architectural proteins in human diseases (in Chinese). *Sci Sin-Vitae*, 2023, 53: 1575–1594 [曹红, 吴迪, 魏瑜, 等. 染色质结构蛋白变异与人类疾病. *中国科学: 生命科学*, 2023, 53: 1575–1594]
- 4 Kobayashi W, Kurumizaka H. Structural transition of the nucleosome during chromatin remodeling and transcription. *Curr Opin Struct Biol*, 2019, 59: 107–114
- 5 Zhou K, Gaullier G, Luger K. Nucleosome structure and dynamics are coming of age. *Nat Struct Mol Biol*, 2019, 26: 3–13
- 6 Brahma S, Henikoff S. Epigenome regulation by dynamic nucleosome unwrapping. *Trends Biochem Sci*, 2020, 45: 13–26
- 7 Kono H, Ishida H. Nucleosome unwrapping and unstacking. *Curr Opin Struct Biol*, 2020, 64: 119–125
- 8 Ahmad K, Henikoff S, Ramachandran S. Managing the steady state chromatin landscape by nucleosome dynamics. *Annu Rev Biochem*, 2022, 91: 183–195
- 9 Felsenfeld G. Chromatin unfolds. *Cell*, 1996, 86: 13–19
- 10 Polach K J, Widom J. Mechanism of protein access to specific DNA sequences in chromatin: a dynamic equilibrium model for gene regulation. *J Mol Biol*, 1995, 254: 130–149
- 11 Polach K J, Widom J. A model for the cooperative binding of eukaryotic regulatory proteins to nucleosomal target sites. *J Mol Biol*, 1996, 258: 800–812
- 12 Anderson J D, Widom J. Sequence and position-dependence of the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA target sites. *J Mol Biol*, 2000, 296: 979–987
- 13 Clegg R M. Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. *Methods Enzymol*, 1992, 211: 353–388
- 14 Li G, Widom J. Nucleosomes facilitate their own invasion. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, 11: 763–769
- 15 Li G, Levitus M, Bustamante C, et al. Rapid spontaneous accessibility of nucleosomal DNA. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, 12: 46–53
- 16 Hodges C, Bintu L, Lubkowska L, et al. Nucleosomal fluctuations govern the transcription dynamics of RNA polymerase II. *Science*, 2009, 325: 626–628
- 17 Koopmans W J A, Buning R, Schmidt T, et al. spFRET using alternating excitation and FCS reveals progressive DNA unwrapping in nucleosomes. *Biophys J*, 2009, 97: 195–204
- 18 Shlyakhtenko L S, Lushnikov A Y, Lyubchenko Y L. Dynamics of nucleosomes revealed by time-lapse atomic force microscopy. *Biochemistry*, 2009, 48: 7842–7848
- 19 Miyagi A, Ando T, Lyubchenko Y L. Dynamics of nucleosomes assessed with time-lapse high-speed atomic force microscopy. *Biochemistry*, 2011, 50: 7901–7908
- 20 Bintu L, Kopaczynska M, Hodges C, et al. The elongation rate of RNA polymerase determines the fate of transcribed nucleosomes. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, 18: 1394–1399
- 21 Katan A J, Vlijm R, Lusser A, et al. Dynamics of nucleosomal structures measured by high-speed atomic force microscopy. *Small*, 2015, 11:

- 976–984
- 22 Dufrène Y F, Ando T, Garcia R, et al. Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nat Nanotech*, 2017, 12: 295–307
- 23 Ando T. High-speed atomic force microscopy and its future prospects. *Biophys Rev*, 2018, 10: 285–292
- 24 Konrad S F, Vanderlinden W, Frederickx W, et al. High-throughput AFM analysis reveals unwrapping pathways of H3 and CENP-A nucleosomes. *Nanoscale*, 2021, 13: 5435–5447
- 25 Kato D, Osakabe A, Arimura Y, et al. Crystal structure of the overlapping dinucleosome composed of hexasome and octasome. *Science*, 2017, 356: 205–208
- 26 Bilokapic S, Strauss M, Halic M. Histone octamer rearranges to adapt to DNA unwrapping. *Nat Struct Mol Biol*, 2018, 25: 101–108
- 27 Bilokapic S, Strauss M, Halic M. Structural rearrangements of the histone octamer translocate DNA. *Nat Commun*, 2018, 9: 1330
- 28 Armeev G A, Moiseenko A V, Motorin N A, et al. Structure and dynamics of a nucleosome core particle based on Widom 603 DNA sequence. *Structure*, 2025, 33: 948–959.e5
- 29 Kujirai T, Ehara H, Fujino Y, et al. Structural basis of the nucleosome transition during RNA polymerase II passage. *Science*, 2018, 362: 595–598
- 30 Ehara H, Kujirai T, Shirouzu M, et al. Structural basis of nucleosome disassembly and reassembly by RNAPII elongation complex with FACT. *Science*, 2022, 377: eabp9466
- 31 Zhang M, Jungblut A, Kunert F, et al. Hexasome-INO80 complex reveals structural basis of noncanonical nucleosome remodeling. *Science*, 2023, 381: 313–319
- 32 Girvan P, Jalal A S B, McCormack E A, et al. Nucleosome flipping drives kinetic proofreading and processivity by SWR1. *Nature*, 2024, 636: 251–257
- 33 Tan Z, Yue Y, Leprevost F, et al. Autoinhibited kinesin-1 adopts a hierarchical folding pattern. *eLife*, 2023, 12: RP86776
- 34 Noll M. Subunit structure of chromatin. *Nature*, 1974, 251: 249–251
- 35 Segal E, Fondufe-Mittendorf Y, Chen L, et al. A genomic code for nucleosome positioning. *Nature*, 2006, 442: 772–778
- 36 Lee W, Tillo D, Bray N, et al. A high-resolution atlas of nucleosome occupancy in yeast. *Nat Genet*, 2007, 39: 1235–1244
- 37 Kaplan N, Moore I K, Fondufe-Mittendorf Y, et al. The DNA-encoded nucleosome organization of a eukaryotic genome. *Nature*, 2009, 458: 362–366
- 38 Henikoff J G, Belsky J A, Krassovsky K, et al. Epigenome characterization at single base-pair resolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 18318–18323
- 39 Kent N A, Adams S, Moorhouse A, et al. Chromatin particle spectrum analysis: a method for comparative chromatin structure analysis using paired-end mode next-generation DNA sequencing. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: e26
- 40 Weber C M, Henikoff J G, Henikoff S. H2A.Z nucleosomes enriched over active genes are homotypic. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, 17: 1500–1507
- 41 Wen Z, Zhang L, Ruan H, et al. Histone variant H2A.Z regulates nucleosome unwrapping and CTCF binding in mouse ES cells. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48: 5939–5952
- 42 Ramachandran S, Ahmad K, Henikoff S. Transcription and remodeling produce asymmetrically unwrapped nucleosomal intermediates. *Mol Cell*, 2017, 68: 1038–1053.e4
- 43 Ramani V, Qiu R, Shendure J. High sensitivity profiling of chromatin structure by MNase-SSP. *Cell Rep*, 2019, 26: 2465–2476.e4
- 44 Rhee H S, Bataille A R, Zhang L, et al. Subnucleosomal structures and nucleosome asymmetry across a genome. *Cell*, 2014, 159: 1377–1388
- 45 Rychkov G N, Ilatovskiy A V, Nazarov I B, et al. Partially assembled nucleosome structures at atomic detail. *Biophys J*, 2017, 112: 460–472
- 46 Xi Y, Yao J, Chen R, et al. Nucleosome fragility reveals novel functional states of chromatin and poises genes for activation. *Genome Res*, 2011, 21: 718–724
- 47 Fei J, Torigoe S E, Brown C R, et al. The prenucleosome, a stable conformational isomer of the nucleosome. *Genes Dev*, 2015, 29: 2563–2575
- 48 Tims H S, Gurunathan K, Levitus M, et al. Dynamics of nucleosome invasion by DNA binding proteins. *J Mol Biol*, 2011, 411: 430–448
- 49 Poirier M G, Bussiek M, Langowski J, et al. Spontaneous access to DNA target sites in folded chromatin fibers. *J Mol Biol*, 2008, 379: 772–786
- 50 Chien F T, van der Heijden T. Characterization of nucleosome unwrapping within chromatin fibers using magnetic tweezers. *Biophys J*, 2014, 107: 373–383

- 51 Wilhelm F X, Wilhelm M L, Erard M, et al. Reconstitution of chromatin: assembly of the nucleosome. *Nucleic Acids Res*, 1978, 5: 505–521
- 52 Jorcano J L, Ruiz-Carrillo A. H3.cntdot.H4 tetramer directs DNA and core histone octamer assembly in the nucleosome core particle. *Biochemistry*, 1979, 18: 768–774
- 53 Oohara I, Wada A. Spectroscopic studies on histone-DNA interactions. *J Mol Biol*, 1987, 196: 399–411
- 54 Gansen A, Valeri A, Hauger F, et al. Nucleosome disassembly intermediates characterized by single-molecule FRET. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 15308–15313
- 55 Böhm V, Hieb A R, Andrews A J, et al. Nucleosome accessibility governed by the dimer/tetramer interface. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: 3093–3102
- 56 Chen Y, Tokuda J M, Topping T, et al. Asymmetric unwrapping of nucleosomal DNA propagates asymmetric opening and dissociation of the histone core. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 334–339
- 57 Bennink M L, Leuba S H, Leno G H, et al. Unfolding individual nucleosomes by stretching single chromatin fibers with optical tweezers. *Nat Struct Biol*, 2001, 8: 606–610
- 58 Brower-Toland B D, Smith C L, Yeh R C, et al. Mechanical disruption of individual nucleosomes reveals a reversible multistage release of DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 1960–1965
- 59 Mihadja S, Spakowitz A J, Zhang Y, et al. Effect of force on mononucleosomal dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 15871–15876
- 60 Ngo T T M, Zhang Q, Zhou R, et al. Asymmetric unwrapping of nucleosomes under tension directed by DNA local flexibility. *Cell*, 2015, 160: 1135–1144
- 61 Hall M A, Shundrovsky A, Bai L, et al. High-resolution dynamic mapping of histone-DNA interactions in a nucleosome. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, 16: 124–129
- 62 Chua E Y D, Vasudevan D, Davey G E, et al. The mechanics behind DNA sequence-dependent properties of the nucleosome. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 6338–6352
- 63 North J A, Shimko J C, Javaid S, et al. Regulation of the nucleosome unwrapping rate controls DNA accessibility. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 10215–10227
- 64 Tóth K, Böhm V, Sellmann C, et al. Histone- and DNA sequence-dependent stability of nucleosomes studied by single-pair FRET. *Cytometry Pt A*, 2013, 83: 839–846
- 65 Davey C A, Sargent D F, Luger K, et al. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9Å resolution. *J Mol Biol*, 2002, 319: 1097–1113
- 66 Simon M, North J A, Shimko J C, et al. Histone fold modifications control nucleosome unwrapping and disassembly. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 12711–12716
- 67 Suto R K, Clarkson M J, Tremethick D J, et al. Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat Struct Biol*, 2000, 7: 1121–1124
- 68 Li S, Wei T, Panchenko A R. Histone variant H2A.Z modulates nucleosome dynamics to promote DNA accessibility. *Nat Commun*, 2023, 14: 769
- 69 Morioka S, Sato S, Horikoshi N, et al. High-speed atomic force microscopy reveals spontaneous nucleosome sliding of H2A.Z at the subsecond time scale. *Nano Lett*, 2023, 23: 1696–1704
- 70 Hainer S J, Fazzio T G. Regulation of nucleosome architecture and factor binding revealed by nuclease footprinting of the ESC genome. *Cell Rep*, 2015, 13: 61–69
- 71 Weber C M, Ramachandran S, Henikoff S. Nucleosomes are context-specific, H2A.Z-modulated barriers to RNA polymerase. *Mol Cell*, 2014, 53: 819–830
- 72 Chen Z, Gabizon R, Brown A I, et al. High-resolution and high-accuracy topographic and transcriptional maps of the nucleosome barrier. *eLife*, 2019, 8: e48281
- 73 Pehrson J R, Fried V A. MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science*, 1992, 257: 1398–1400
- 74 Chakravarthy S, Patel A, Bowman G D. The basic linker of macroH2A stabilizes DNA at the entry/exit site of the nucleosome. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 8285–8295
- 75 Fukagawa T, Earnshaw W C. The centromere: chromatin foundation for the kinetochore machinery. *Dev Cell*, 2014, 30: 496–508
- 76 Furuyama T, Henikoff S. Centromeric nucleosomes induce positive DNA supercoils. *Cell*, 2009, 138: 104–113

- 77 Huang C C, Chang K M, Cui H, et al. Histone H3-variant Cse4-induced positive DNA supercoiling in the yeast plasmid has implications for a plasmid origin of a chromosome centromere. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 13671–13676
- 78 Krassovsky K, Henikoff J G, Henikoff S. Tripartite organization of centromeric chromatin in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 243–248
- 79 Migl D, Kschonsak M, Arthur C P, et al. Cryoelectron microscopy structure of a yeast centromeric nucleosome at 2.7 Å resolution. *Structure*, 2020, 28: 363–370.e3
- 80 Kawasaki O, Takizawa Y, Kiyokawa I, et al. Cryo-EM analysis of a unique subnucleosome containing centromere-specific histone variant CENP-A. *Genes Cells*, 2025, 30: e70016
- 81 Tessarz P, Kouzarides T. Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15: 703–708
- 82 Yan H Y, Zhang H Q. Role of histone acylation and related technical developments (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2023, 53: 1613–1625 [闫昊一, 张宏权. 组蛋白酰基化修饰作用及其相关技术进展. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 1613–1625]
- 83 Xu R M, Li C, Liu X Y, et al. Regulation of histone modifications during human early embryo development (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2024, 54: 84–93 [徐睿敏, 李翀, 刘晓雨, 等. 人类早期胚胎发育过程中组蛋白修饰的调控. 中国科学: 生命科学, 2024, 54: 84–93]
- 84 Anderson J D, Lowary P T, Widom J. Effects of histone acetylation on the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA target sites 1 Edited by R. Ebright. *J Mol Biol*, 2001, 307: 977–985
- 85 Bintu L, Ishibashi T, Dangkulwanich M, et al. Nucleosomal elements that control the topography of the barrier to transcription. *Cell*, 2012, 151: 738–749
- 86 Konrad S F, Vanderlinden W, Lipfert J. Quantifying epigenetic modulation of nucleosome breathing by high-throughput AFM imaging. *Biophys J*, 2022, 121: 841–851
- 87 North J A, Javadi S, Ferdinand M B, et al. Phosphorylation of histone H3(T118) alters nucleosome dynamics and remodeling. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: 6465–6474
- 88 Hayes J J, Pruss D, Wolffe A P. Contacts of the globular domain of histone H5 and core histones with DNA in a “chromatosome”. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 7817–7821
- 89 Caterino T L, Hayes J J. Structure of the H1 C-terminal domain and function in chromatin condensation. *Biochem Cell Biol*, 2011, 89: 35–44
- 90 Bernier M, Luo Y, Nwokolo K C, et al. Linker histone H1 and H3K56 acetylation are antagonistic regulators of nucleosome dynamics. *Nat Commun*, 2015, 6: 10152
- 91 Clapier C R, Iwasa J, Cairns B R, et al. Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18: 407–422
- 92 Reid X J, Low J K K, Mackay J P. A NuRD for all seasons. *Trends Biochem Sci*, 2023, 48: 11–25
- 93 Tencer A H, Cox K L, Di L, et al. Covalent modifications of histone H3K9 promote binding of CHD3. *Cell Rep*, 2017, 21: 455–466
- 94 Farnung L, Vos S M, Wigge C, et al. Nucleosome-Chd1 structure and implications for chromatin remodelling. *Nature*, 2017, 550: 539–542
- 95 Willhoft O, Ghoneim M, Lin C L, et al. Structure and dynamics of the yeast SWR1-nucleosome complex. *Science*, 2018, 362: eaat7716
- 96 Ayala R, Willhoft O, Aramayo R J, et al. Structure and regulation of the human INO80-nucleosome complex. *Nature*, 2018, 556: 391–395
- 97 Eustermann S, Schall K, Kostrewa D, et al. Structural basis for ATP-dependent chromatin remodelling by the INO80 complex. *Nature*, 2018, 556: 386–390
- 98 Sia Y, Pan H, Chen K, et al. Structural insights into chromatin remodeling by ISWI during active ATP hydrolysis. *Science*, 2025, doi: 10.1126/science.adu5654
- 99 Stewart-Morgan K R, Petryk N, Groth A. Chromatin replication and epigenetic cell memory. *Nat Cell Biol*, 2020, 22: 361–371
- 100 Escobar T M, Loyola A, Reinberg D. Parental nucleosome segregation and the inheritance of cellular identity. *Nat Rev Genet*, 2021, 22: 379–392
- 101 Zeng K N, Zhu B. Departure is for reunion: how do old nucleosomes get recycled after replication. *Sci Sin-Vitae*, 2024, 54: 2482–2484
- 102 Hammond C M, Strømme C B, Huang H, et al. Histone chaperone networks shaping chromatin function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18: 141–158
- 103 Liu C P, Yu Z, Xiong J, et al. Structural insights into histone binding and nucleosome assembly by chromatin assembly factor-1. *Science*, 2023, 381: eadd8673
- 104 Nozawa K, Takizawa Y, Pierrakeas L, et al. Cryo-electron microscopy structure of the H3-H4 octasome: a nucleosome-like particle without

- histones H2A and H2B. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2022, 119: e2206542119
- 105 Aguilar-Gurrieri C, Larabi A, Vinayachandran V, et al. Structural evidence for Nap1-dependent H2A-H2B deposition and nucleosome assembly. [EMBO J](#), 2016, 35: 1465–1482
- 106 Nagae F, Takada S, Terakawa T. Histone chaperone Nap1 dismantles an H2A/H2B dimer from a partially unwrapped nucleosome. [Nucleic Acids Res](#), 2023, 51: 5351–5363
- 107 Zhou K, Liu Y, Luger K. Histone chaperone FACT FACilitates Chromatin Transcription: mechanistic and structural insights. [Curr Opin Struct Biol](#), 2020, 65: 26–32
- 108 Kemble D J, McCullough L L, Whitby F G, et al. FACT disrupts nucleosome structure by binding H2A-H2B with conserved peptide motifs. [Mol Cell](#), 2015, 60: 294–306
- 109 Chen P, Dong L, Hu M, et al. Functions of FACT in breaking the nucleosome and maintaining its integrity at the single-nucleosome level. [Mol Cell](#), 2018, 71: 284–293.e4
- 110 Wang T, Liu Y, Edwards G, et al. The histone chaperone FACT modulates nucleosome structure by tethering its components. [Life Sci Alliance](#), 2018, 1: e201800107
- 111 Liu Y, Zhou K, Zhang N, et al. FACT caught in the act of manipulating the nucleosome. [Nature](#), 2020, 577: 426–431
- 112 Ramachandran S, Henikoff S. Transcriptional regulators compete with nucleosomes post-replication. [Cell](#), 2016, 165: 580–592
- 113 Wen Z, Fang R, Zhang R, et al. Nucleosome wrapping states encode principles of 3D genome organization. [Nat Commun](#), 2025, 16: 352
- 114 Chen X, Wang X, Liu W, et al. Structures of +1 nucleosome-bound PIC-Mediator complex. [Science](#), 2022, 378: 62–68
- 115 Filipovski M, Soffers J H M, Vos S M, et al. Structural basis of nucleosome retention during transcription elongation. [Science](#), 2022, 376: 1313–1316
- 116 Ma J, Wang M. Interplay between DNA supercoiling and transcription elongation. [Transcription](#), 2014, 5: e28636
- 117 Sheinin M Y, Li M, Soltani M, et al. Torque modulates nucleosome stability and facilitates H2A/H2B dimer loss. [Nat Commun](#), 2013, 4: 2579
- 118 Ishida H, Kono H. Torsional stress can regulate the unwrapping of two outer half superhelical turns of nucleosomal DNA. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2021, 118: e2020452118
- 119 Shi X, Fedulova A S, Kotova E Y, et al. Histone tetrasome dynamics affects chromatin transcription. [Nucleic Acids Res](#), 2025, 53: gkaf356
- 120 Hsieh L J, Gourdet M A, Moore C M, et al. A hexasome is the preferred substrate for the INO80 chromatin remodeling complex, allowing versatility of function. [Mol Cell](#), 2022, 82: 2098–2112.e4
- 121 Li X, Feng H, Zhang J, et al. Analysis of chromatin fibers in HeLa cells with electron tomography. [Biophys Rep](#), 2015, 1: 51–60
- 122 Beel A J, Azubel M, Mattei P J, et al. Structure of mitotic chromosomes. [Mol Cell](#), 2021, 81: 4369–4376.e3
- 123 Hou Z, Nightingale F, Zhu Y, et al. Structure of native chromatin fibres revealed by Cryo-ET *in situ*. [Nat Commun](#), 2023, 14: 6324
- 124 Hatazawa S, Fukuda Y, Kobayashi Y, et al. Cryo-EM structures of native chromatin units from human cells. [Genes Cells](#), 2025, 30: e70019

Subnucleosome—where does it come from?

WEN ZengQi^{1*} & LONG HaiZhen^{2*}

¹ School of Medicine, Shenzhen Campus of Sun Yat-sen University, Shenzhen 518107, China

² Institute of Molecular Physiology, Shenzhen Bay Laboratory, Shenzhen 518132, China

* Corresponding authors, E-mail: wenzq7@mail.sysu.edu.cn; longhaizhen@szbl.ac.cn

In eukaryotes, the genome is compactly organized within the nucleus as chromatin, with nucleosomes serving as its fundamental structural units. Rather than being static, nucleosomes exhibit substantial structural dynamics, closely tied to chromatin regulation and function. Recent technological advances have revealed that dynamic remodeling of nucleosomes gives rise to diverse subnucleosomal structures, which contribute to chromatin architecture modulation and biological function regulation. As emerging epigenetic features, subnucleosomes have garnered increasing interest. This review highlights recent advances in the study of subnucleosomal structures using single-molecule techniques, atomic force microscopy, cryo-electron microscopy, and high-throughput sequencing, with a focus on their dynamic characteristics and the molecular mechanisms underlying their formation during chromatin remodeling, transcription, and DNA replication.

subnucleosome, epigenetics, remodeling, transcription, DNA replication

doi: [10.1360/SSV-2025-0130](https://doi.org/10.1360/SSV-2025-0130)